INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

Alana Maria Cerqueira de Oliveira
(Organizadora)

2

Ano 2022

INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

Alana Maria Cerqueira de Oliveira
(Organizadora)

2

Ano 2022

Interação parasito-hospedeiro 2

Diagramação: Gabriel Motomu Teshima
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Alana Maria Cerqueira de Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

I61 Interação parasito-hospedeiro 2 / Organizadora Alana Maria Cerqueira de Oliveira. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5983-870-7
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.707222601

1. Parasito-hospedeiro. I. Oliveira, Alana Maria Cerqueira de (Organizadora). II. Título.

CDD 616.96

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

APRESENTAÇÃO

A Obra “Interação parasito-hospedeiro 2”, traz ao leitor cinco capítulos de relevada importância na área de Imunologia, Parasitologia e Genética. Entretanto, caracteriza-se como uma obra multidisciplinar que vai do estudo de parasitas de interesse humano a parasitas de interesses veterinário englobando os zoonóticos.

Os capítulos estão distribuídos em temáticas que abordam de forma categorizada e interdisciplinar a relação parasito-hospedeiro, as pesquisas englobam estudos de: polimorfismos genéticos, fases do ciclo de vida do parasita, expressão de citocinas, respostas imunológicas, técnicas de biologia molecular (extração de RNA, RT-PCR), técnicas de parasitologia, técnicas de imunologia, técnicas microbiológicas, transmissão zoonótica, doenças negligenciadas, virulência, patogenicidade, bioinseticida, Infecções oportunistas e resistência bacteriana.

A obra foi elaborada primordialmente com foco nos profissionais, pesquisadores e estudantes pertencentes às área de Parasitologia Médica e Veterinária e suas interfaces ou áreas afins. Entretanto, é uma leitura interessante para todos aqueles que de alguma forma se interessam pela área.

Cada capítulo foi elaborado com o propósito de transmitir a informação científica de maneira clara e efetiva, em português, inglês ou espanhol. Utilizando uma linguagem acessível, concisa e didática, atraindo a atenção do leitor, independente se seu interesse é acadêmico ou profissional.

O livro “ Interação parasito-hospedeiro 2”, traz publicações atuais e a Atena Editora traz uma plataforma que oferece uma estrutura adequada, propícia e confiável para a divulgação científica de diversas áreas de pesquisa.

Alana Maria Cerqueira de Oliveira

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

PAPEL DEL POLIMORFISMO DEL GEN HAPTOGLOBINA EN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN CON ANTÍGENOS DE *PLASMODIUM VIVAX*

Data de aceite: 01/11/2021

Paco Raffoul
Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental “Miguel Layrisse” Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

Fernando Hernández
Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental “Miguel Layrisse” Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

Albina Wide
Escuela de Medicina “Luis Razetti”, Cátedra de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Facultad de Medicina
Universidad Central de Venezuela
Caracas, Venezuela

Jacinta Capaldo
Laboratorio para Estudios sobre Malaria Instituto de Altos Estudios en Salud Pública “Dr. Arnoldo Gabaldón”
Caracas, Venezuela

Mercedes Fernández-Mestre
Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental “Miguel Layrisse” Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

RESUMEN: La malaria es una enfermedad infecciosa causada por especies de parásitos del género *Plasmodium*. Durante la fase eritrocítica, del ciclo de vida parasitario, ocurre la ruptura de los glóbulos rojos infectados, liberándose la hemoglobina y antígenos parasitarios al torrente sanguíneo, estimulándose así el sistema inmunológico. Para evitar los efectos perjudiciales del hemo libre, la haptoglobina (Hp) une rápidamente la hemoglobina (Hb), formando el complejo Hb-Hp estable. Este complejo es reconocido por CD163 y fagocitado por el macrófago. El gen haptoglobina posee dos alelos, generando tres genotipos que codifican para tres proteínas estructural y funcionalmente distintas. Considerando que la haptoglobina actúa como modulador del sistema inmunitario y que la fase eritrocítica del *Plasmodium* es la responsable de la clínica de la malaria, estudiamos el posible papel del polimorfismo del gen haptoglobina en la expresión de citoquinas en respuesta a la estimulación con antígenos de *Plasmodium vivax.* Para ello se realizó un ensayo de estimulación *ex vivo* de muestras sanguíneas de individuos sanos, con genotipo haptoglobina conocido, con antígenos de *P. vivax*. Finalizada la estimulación, se extrajo el ARN total, se sintetizó el ADN complementario y se determinó las citoquinas expresadas por RT-PCR. Los resultados mostraron una expresión incrementada de las citoquinas proinflamatorias, tipo Th1, en los individuos con el genotipo *HP2-2* y una mayor expresión de las citoquinas antiinflamatorias, Tipo Th2, en los individuos con el genotipo *HP1-1*. En conclusión, la expresión de citoquinas está correlacionada con el genotipo

de haptoglobina, el cual puede influir en el tipo de enfermedad desarrollada.
PALABRAS CLAVES: Malaria, *Plasmodium vivax*, Polimorfismo, Haptoglobina, Citoquinas.

ABSTRACT: Malaria is an infectious disease caused by species of parasites of the genus *Plasmodium*. During the erythrocytic phase of the parasitic life cycle, the infected red blood cells rupture, releasing hemoglobin and parasitic antigens into the bloodstream, thus stimulating the immune system. To avoid the damaging effects of free heme, haptoglobin (Hp) rapidly binds hemoglobin (Hb), forming the stable Hb-Hp complex. This complex is recognized by CD163 and phagocytosed by the macrophage. The haptoglobin gene has two alleles, generating three genotypes that code for three structurally and functionally distinct proteins. Considering that haptoglobin acts as a modulator of the immune system and that the erythrocytic phase of *Plasmodium* is responsible for the symptoms of malaria, we study the possible role of the polymorphism of the haptoglobin gene in the expression of cytokines in response to stimulation with antigens of *Plasmodium vivax*. For this, an *ex vivo* stimulation test was carried out on blood samples from healthy individuals, with known haptoglobin genotype, with *P. vivax* antigens. After the stimulation, the total RNA was extracted, the complementary DNA was synthesized and the cytokines expressed by RT-PCR were determined. The results showed an increased expression of pro-inflammatory cytokines, type Th1, in individuals with the HP2-2 genotype and a greater expression of anti-inflammatory cytokines, Type Th2, in individuals with the HP1-1 genotype. In conclusion, the expression of cytokines is correlated with the haptoglobin genotype, which can influence the type of disease developed.
KEYWORDS: Malaria, Plasmodium vivax, Polymorphism, Haptoglobin, Cytokines.

1 I INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa causada por parásitos pertenecientes al género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos del género *Anopheles.* De las seis especies causantes de la infección en el humano, *Plasmodium falciparum* es la responsable de la mayoría de los casos severos y muerte por malaria a nivel mundial, principalmente en el continente africano. Por otra parte, *Plasmodium vivax* es la especie responsable de la morbilidad fuera de África (Milner, 2018). Venezuela es uno de los países que ha registrado un incremento drástico en el número de infecciones, de 35500 casos en el año 2000 a más de 467000 casos en el 2019, acumulando un 55% de las muertes causadas por esta enfermedad en la región de América, y junto a Brasil y Colombia presentan más del 86% de todos los casos de la región (WHO, 2020). Los parásitos de la malaria humana tienen un ciclo de vida complejo, que alterna entre dos hospedadores: un invertebrado (los mosquitos hembras *Anopheles* spp.), que se comporta como vector y hospedador definitivo, y un vertebrado u hospedador intermediario (el hombre). En el hombre, la infección incluye un ciclo pre-eritrocítico y un ciclo eritrocítico, siendo este último el responsable de los signos y síntomas clínicos de la malaria (Revisado en Wide et al., 2011). Después de la replicación dentro del eritrocito, el parásito de la malaria causa la ruptura de la membrana de los glóbulos rojos, liberando así hemoglobina, hemoglobina parcialmente degradada

y hemozoína en la circulación (Hunt et al., 2001). La hemoglobina es el transportador fundamental de oxígeno en la sangre, pero también es un componente potencial de daño tisular debido a su grupo hemo altamente reactivo. Este grupo hemo contiene hierro, el cual cataliza la generación de especies reactivas de oxígeno a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Sadrzadeh et al., 1984). Para evitar los efectos perjudiciales del hemo libre, los hospederos han desarrollado varios mecanismos homeostáticos, incluida la enzima haptoglobina (Hp). La haptoglobina puede eliminar rápidamente la hemoglobina (Hb) libre de células formando el complejo Hb-Hp estable, que es reconocido e internalizado por el receptor CD163 expresado por los monocitos y macrófagos (Shim et al., 1965; Lim et al., 1998). La haptoglobina es una proteína tetramérica (α2β2) que se caracteriza por la heterogeneidad de la cadena α debido a una duplicación intragénica que resultó en dos alelos diferentes, *HP2* y *HP1* (incluidas dos subvariantes, Hp1F y Hp1S). La diversidad en los fenotipos de Hp, determinado por el genotipo, causa diferentes afinidades de unión por la Hb libre de células (Hp1.1> Hp1.2> Hp2.2) y por CD163 (Hp2.2> Hp1.2> Hp1.1). Además, los polimorfismos en el gen de la haptoglobina (*HP*) se han asociado con diferentes capacidades funcionales y respuestas orgánicas, incluidas alteraciones en la regulación inmunitaria, estrés oxidativo y deslocalización del hierro dentro de los monocitos (Mendonça et al., 2012).

Considerando que la Hp posee una función inmunomoduladora, ejercida a través de la unión del complejo Hb-Hp al receptor de superficie CD163, se analizó el posible papel del polimorfismo del gen haptoglobina en la expresión de citoquinas en respuesta a la estimulación con antígenos de *Plasmodium vivax.*

2 I MÉTODOS

Población de estudio

En la presente investigación, se incluyeron 21 individuos aparentemente sanos, no relacionados, procedentes de zonas sin transmisión de malaria, sin antecedentes de infección malárica y transfusión sanguínea no infectados, sin infección por *Plasmodium* spp y con genotipo haptoglobina conocido. Estos individuos fueron clasificados de acuerdo al genotipo *HP* en tres grupos:

Grupo 1 (n=6). Individuos con el genotipo homocigoto *HP1-1*

Grupo 2 (n=7). Individuos con el genotipo heterocigoto *HP2-1*

Grupo 3 (n=8). Individuos con el genotipo homocigoto *HP2-2*

Previo a la toma de las muestras, a los individuos participantes se les solicitó la firma de un consentimiento. Cada individuo fue instruido acerca del estudio y del empleo que se le daría a la muestra. Este consentimiento fue aprobado por el comité de Bioética del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC).

Preparación del antígeno crudo de *P. vivax*

El antígeno crudo de *P. vivax* se obtuvo a partir de sangre total de tres pacientes infectados, con una parasitemia promedio de 21870 parásitos/mL de sangre. Estas muestras de sangre presentaban los estadíos sexuales y asexuales del parásito. Posteriormente, se eliminó la hemoglobina mediante tratamiento con saponina al 0.2% (p/v) y por congelamiento/descongelamiento. Luego se resuspendieron los glóbulos rojos infectados y no infectados en PBS (0.02 mM; pH 7.2) + Inhibidor de proteasa (PMSF; 1 mM). A continuación, se realizaron 20 ciclos de sonicación, de 1 minuto cada uno a 100 vatios y a 4 °C. Después de completar la sonicación del antígeno, se procedió a centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos, para obtener el sobrenadante, que contiene el antígeno. Finalmente, el antígeno se almacenó a -70 °C hasta su uso. La concentración del antígeno se determinó mediante el método de Bradford modificado (Bradford, 1976).

Ensayo *ex vivo* de estimulación con antígenos de *P. vivax*

Debido a que en condiciones de reposo o de no estimulación la producción de citoquinas es baja e indetectable, se procedió a realizar un ensayo *ex vivo* en sangre total utilizando antígenos de *P. vivax.* El ensayo consistió en la estimulación de la muestra de sangre venosa anticoagulada, obtenida de los diferentes individuos, con antígenos de *P. vivax*, siguiendo un protocolo cinético de activación considerando los diferentes tiempos de expresión de cada citoquina incluida en el experimento.

La sangre obtenida de cada individuo fue mezclada en una proporción 1:4 en medio RPMI completo (medio RPMI 1640 suplementado con 1 % de Glutamina, 1 % de penicilina y 10 % de suero fetal bovino), y se transfirieron 500 µL a tubos de 1.5 mL estériles. Posteriormente, se procedió a realizar la estimulación con el antígeno crudo de *P. vivax* a una concentración de 1 µg/ml. Tras la estimulación se procedió a incubar las muestras en tubos estériles por un tiempo no mayor a 24 horas (h), a 37ºC y 5% de CO_2. Con respecto a los tiempos de incubación, se consideró la vida media de cada citoquina y los estudios realizados previamente en el laboratorio. Por consiguiente, fueron considerados cuatro tiempos fundamentales de incubación: tiempo de activación temprana (90 minutos y 4 h) y tiempo de activación tardía (8 y 24 h). Una vez transcurridos los tiempos de incubación se procedió a la extracción del ARN total.

Extracción de ARN total empleando TRIzol®Reagent

La extracción del ARN fue realizada con TRIzol® Reagent siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial (Life Technologies Corporation).

Síntesis del ADN complementario

Una vez obtenido el ARN, se procedió a la síntesis del ADN complementario (ADNc), por retro transcripción, empleando el estuche de GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, USA). Para cada muestra, se preparó una mezcla de reacción en la cual se

añadió 500 ng/ μL de ARN, 0.5 μg de oligo dT y se completó hasta un volumen de 9 μL con agua libre de nucleasas. Posteriormente, esta mezcla se incubó a 70ºC por 5 minutos, transcurrido este tiempo se colocó en hielo por 5 minutos.

Para la síntesis de la hebra de ADN, se añadió a cada tubo con la mezcla anterior 10 μL de la siguiente mezcla de reacción: 4 μL de Buffer de reacción 5X, 4 μL de MgCl2 (25mM), 1 μL de la mezcla de nucleótidos dNTP (10mM) y 1 μL de un inhibidor de RNAsas (40 U/μL). Finalmente, se agregó a cada tubo 1μL de la enzima Transcriptasa reversa y se incubó la reacción de acuerdo al siguiente programa: 5°C durante 5 min, 4°C por 1h y 70°C durante 15 min.

Determinación por PCR de la expresión de algunas citoquinas

La determinación de la expresión de las citoquinas IL-1A, IL-1B, IL-12, IL-10, IL-4, TGF-b y TNF-α y del gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehido 3-fosfato-deshidrogenasa) se realizó por PCR, utilizando los iniciadores diseñados con el software Primer 3 (*http//:frodo.wi.mit.edu*). La expresión de IL-6 se realizó utilizando los iniciadores descritos previamente en la literatura (Jang et al., 2006) (Tabla 1).

Para la determinación de la expresión de GAPDH y de cada una de las citoquinas se empleó la siguiente mezcla de reacción: 1X de PCR buffer, 10 µM de cada iniciador (sentido y anti-sentido), 0.2 mM de la mezcla de nucleótidos, 1.5 mM de $MgCl_2$ y 2 U/mL de la enzima Taq Polimerasa (Platinum, Invitrogen) y 1 µL de la muestra de ADN complementario. La amplificación fue realizada de acuerdo al siguiente programa: 95ºC por 5 minutos, 32 ciclos de: desnaturalización a 95ºC por 30 segundos, hibridación (según la temperatura descrita en la Tabla 1) por 40 segundos y una extensión a 72ºC por 30 segundos, finalmente se realizó un ciclo adicional de extensión a 72ºC por 5 minutos. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó por 40 minutos a 100 voltios. Como referencia se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Lucigen).

Análisis estadístico

Con el programa Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories, Inc - 2015) se determinó la intensidad de fluorescencia de GADPH para cada una de las muestras y en base a estas intensidades se normalizaron las intensidades de fluorescencia de cada una de las citoquinas determinadas (relación citoquina/GADPH). Los resultados se expresaron como intensidades de fluorescencia. Finalmente, todos los datos de expresión de citoquinas obtenidos en cada grupo se compararon empleando el Test de Kruskal-Wallis (comparación entre los tres genotipos) y el Test de Mann-Whitney (comparación entre los dos alelos), considerando significativo un valor de $p<0,05$ en el análisis de la expresión de cada una de las citoquinas.

Gen	Iniciadores	Temperatura Hibridación	Tamaño Producto amplificado
GAPDH	F-GAGCCACATCGCTCAGACAC R-CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG	58 ° C	159 pb
IL1B	F-AATGACGCCCTCAATCAAAG R-TCTTGGGCAGTCACATACAA	54° C	182 pb
IL6	F-AGTCTACTCCCTGCTGTCTGAATA R-GGTATACCTAGAGTACCTCCAGAA	50 ° C	643 pb
TNFα	F-TGCTTGTTCCTCAGCCTCTT R-TGGGCTACAGGCTTGTCACT	57 ° C	185 pb
IL10	F-CCAAGCTGAGAACCAAGACC R-AAGGCATTCTTCACCTGCTC	57 ° C	150 pb
IL4	F-TGAACAGCCTCACAGAGCAG R-GCGAGTGTCCTTCTCATGGT	56 ° C	152 pb
TGFB1	F-GTACCTGAACCCGTGTTGCT R-CAACTCCGGTGACATCAAAA	55 ° C	181 pb
IL12A	F-CACTCCAGACCCAGGAATGT R-GGTAAACAGGCCTCCACTGT	57 ° C	177 pb

Tabla 1. Iniciadores utilizados para determinar la expresión de GAPDH y citoquinas, con su correspondiente temperatura de hibridación.

3 I RESULTADOS

Ensayo *ex vivo* de expresión de citoquinas por RT-PCR:

En la figura 2 se muestra la representación gráfica de la expresión total de citoquinas, independientemente del genotipo *HP*, de todos los individuos incluidos en respuesta a la estimulación con antígenos de *P. vivax*. Las citoquinas fueron clasificadas en tres grupos: proinflamatorias (IL-1A, IL-1B, TNF-α e IL-6), adaptativas (IL-4 e IL-12) y reguladoras (IL-10 y TGF-β). Como se puede observar, las citoquinas proinflamatorias IL-1B, TNF-α e IL-6, y la citoquina reguladora TGF-β presentaron una mayor intensidad de expresión.
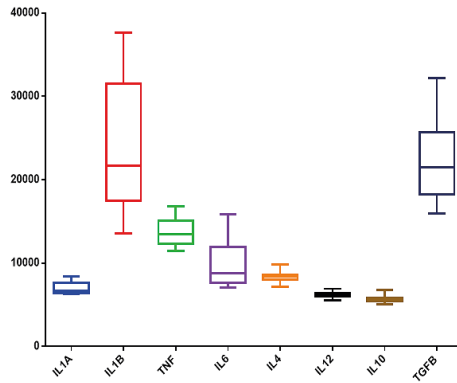
Figura 2. Expresión de algunas citoquinas en respuesta a la estimulación con antígenos de *Plasmodium vivax*. La normalización de la intensidad de fluorescencia de cada banda fue medida y comparada con la intensidad del control interno GADPH. La relación de la intensidad Citoquina/GADPH se realizó para cada una de las citoquinas. Posteriormente las mismas fueron graficadas y comparadas entre sí. El eje de las ordenadas corresponde a la relación Citoquina/GADPH (intensidad de fluorescencia normalizada) y el eje de las abscisas corresponde a cada una de las citoquinas estudiadas.

Al comparar la intensidad de expresión del ARN mensajero de los tres grupos, se observó en el grupo de citoquinas adaptativas (IL-4 e IL-12) una expresión significativamente incrementada de IL-4 en comparación con IL-12 (*p= <0,0001*) (Figura 3).
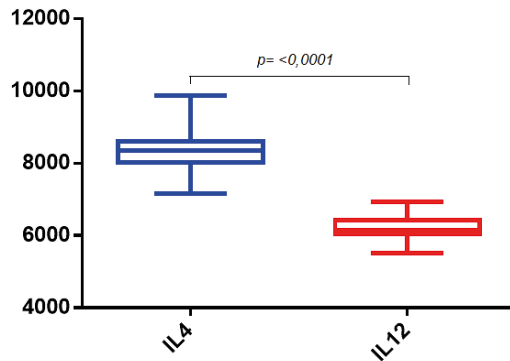
Figura 3. Comparación de la expresión de las citoquinas adaptativas (IL-4 e IL-12), producidas por la estimulación con antígenos de *Plasmodium vivax*. Se representa la intensidad de expresión del ARN mensajero de las citoquinas IL-4 e IL-12 de los individuos incluidos en el estudio. El eje de las ordenadas corresponde a intensidad de expresión (intensidad de fluorescencia normalizada) y el eje de las abscisas corresponde a cada una de las citoquinas.

Comparación de la expresión de citoquinas entre los grupos de individuos clasificados de acuerdo al genotipo *HP*

En la figura 4 se muestra la intensidad de fluorescencia de la expresión de las citoquinas TNF-alfa, IL-1A, IL-1B, IL-4, IL-12, IL-6, IL-10 y TGFβ, en relación a la expresión del gen constitutivo *GADPH*, en cada uno de los grupos de individuos clasificados de acuerdo al genotipo *HP*. Al comparar el promedio de la intensidad de fluorescencia, se observó que las citoquinas IL-1A e IL-6 presentaron una intensidad de expresión mayor en el grupo de individuos *HP2-2* con respecto a los grupos *HP1-1* y *HP1-2*, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Asimismo, las citoquinas IL-4 y TGF-β presentaron una intensidad de expresión mayor en el grupo *HP1-1* con respecto al grupo *HP2-2* y *HP1-2*. Siendo la diferencia de expresión de la citoquina IL-4 significativamente mayor en el grupo de individuos homocigotos para el genotipo *HP1-1* en comparación con el grupo de individuos homocigotos para el genotipo *HP2-2* (8.773 vs. 7.982, *p=0,0426*). Por otra parte, se observó una expresión significativamente disminuida de la citoquina IL-4 en el grupo de individuos homocigotos para el genotipo *HP2-2* con respecto al grupo de individuos con el genotipo heterocigoto *HP1-2* (7.982 vs. 8.433, *p=0,0289*). Cabe destacar, que en el grupo de los individuos con el genotipo heterocigoto *HP1-2* las citoquinas presentaron una intensidad de expresión intermedia con respecto a los grupos de individuos con genotipo homocigoto.
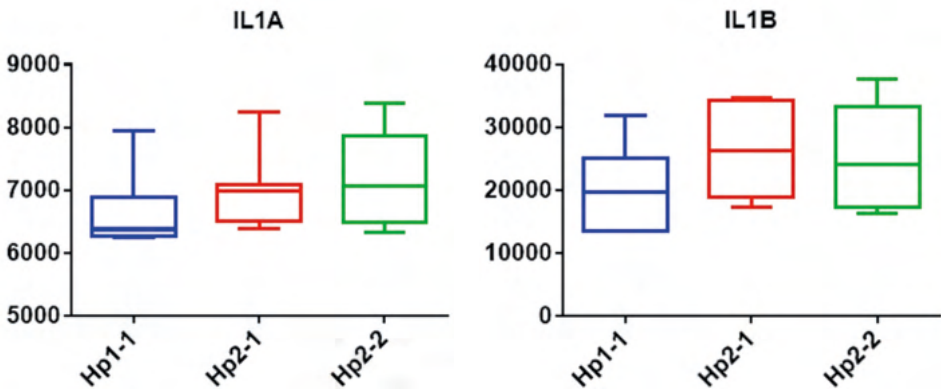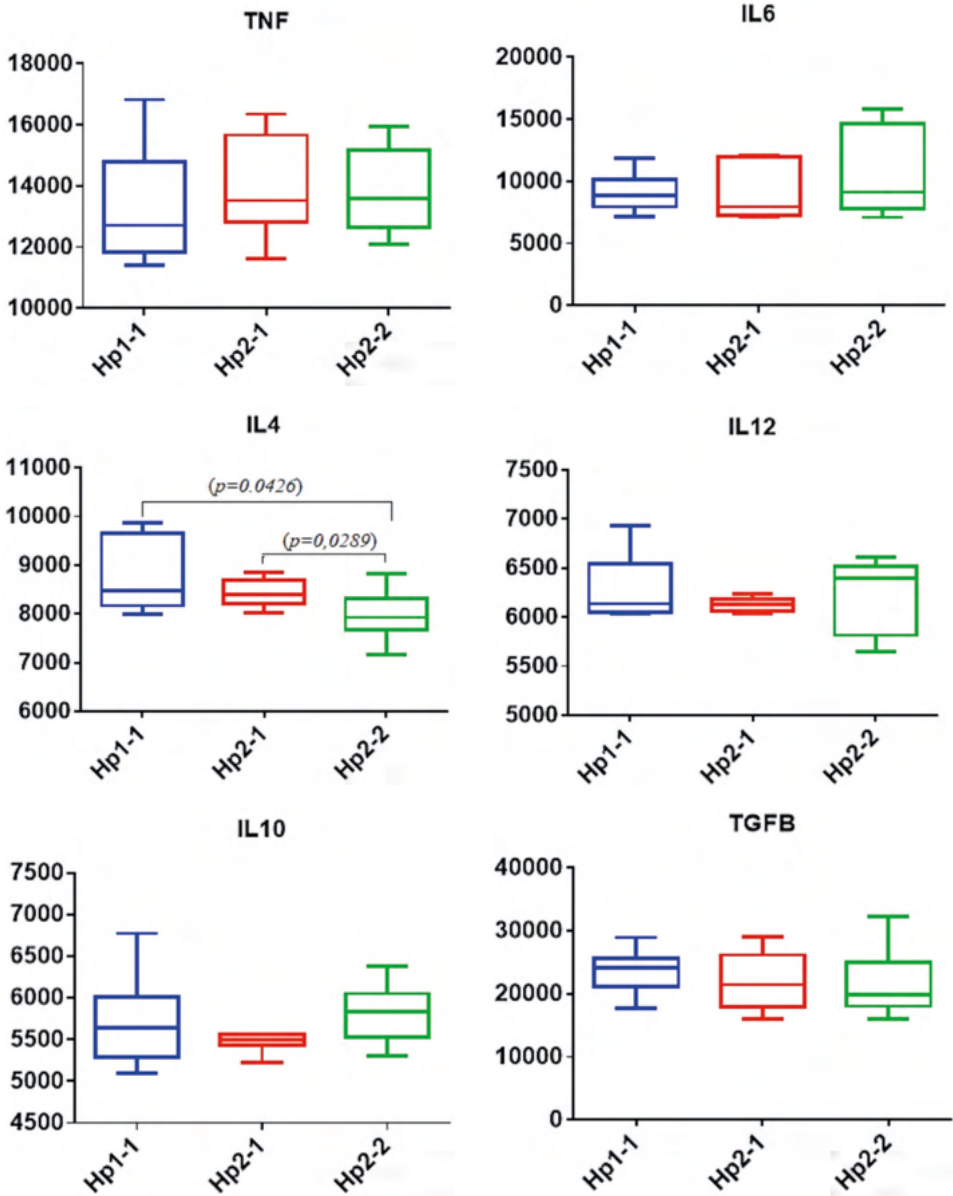
Figura 4. Expresión de algunas citoquinas en respuesta a la estimulación con antígenos de *Plasmodium vivax*, en los diferentes grupos de estudio. El eje de las ordenadas corresponde a la relación Citoquina/ GADPH (intensidad de fluorescencia normalizada) y el eje de las abscisas corresponde a cada uno de los grupos clasificados de acuerdo al genotipo *HP*.

Comparación de la expresión de citoquinas entre los grupos de individuos clasificados de acuerdo al alelo *HP*

Se realizó un análisis comparativo de la expresión del ARN mensajero para cada

citoquina entre los grupos de individuos clasificados de acuerdo al alelo *HP:* individuos con al menos un alelo *HP1* e individuos con al menos un alelo *HP2.*

En el grupo de individuos con al menos un alelo *HP2* se observó una expresión disminuida de la citoquina IL-4, con respecto al grupo de individuos con al menos un alelo *HP1*, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p= 0,0099). (Figura 5).
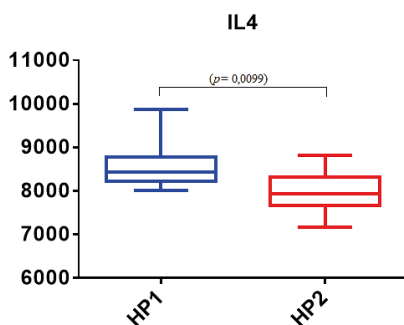
Figura 5. Expresión de IL-4 en respuesta a la estimulación con antígenos de *Plasmodium vivax*, entre los grupos de individuos clasificados de acuerdo al alelo *HP*. El eje de las ordenadas corresponde a la relación Citoquina/GADPH (intensidad de fluorescencia normalizada) y el eje de las abscisas corresponde a cada uno de los grupos clasificados de acuerdo al alelo *HP.*

4 I DISCUSIÓN

Durante la fase eritrocítica los plasmodios (merozoitos) causan la ruptura de los eritrocitos parasitados, lo que trae como consecuencia la liberación al torrente sanguíneo de componentes eritrocitarios (hemoglobina) y parasitarios (hemozoína) (Karunaweera et al., 2003). La exposición antigénica activa al sistema inmunológico, con la liberación de citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico, los cuales son importantes para controlar la infección aguda en la fase sanguínea. Simultáneamente la Hb liberada se une a la Hp plasmática para disminuir sus efectos tóxicos y evitar el estrés oxidativo generalizado (Quaye, 2008). En condiciones basales la Hp se encuentra en una concentración aproximadamente mayor a 400 molar respecto a la Hb libre (Bowman & Kurosky, 2002), sin embargo, la respuesta de fase aguda inducida por el parásito induce un incremento en su síntesis, acción que es mediada por la IL-6 (Oliviero & Cortese, 1989). Además, La Hp posee una función inmunomoduladora, que es ejercida a través de la unión del complejo Hb-Hp al receptor de superficie CD163, que se encarga de su remoción del plasma, respuesta que depende del fenotipo de la haptoglobina (Guetta et al., 2007; Langlois & Delanghe, 1996). Basado en ello, en el presente estudio se estableció el posible papel del polimorfismo del gen de haptoglobina en la expresión de citoquinas en respuesta a la estimulación con antígenos de *Plasmodium vivax.*

Al analizar expresión de citoquinas, ante la exposición al antígeno de *P. vivax*, independientemente del genotipo haptoglobina, se observó intensidades de fluorescencia incrementada de IL-1B, IL-6, y TNF-α. En múltiples estudios, se ha demostrado que la infección por *P. vivax* induce una fuerte respuesta inflamatoria, mediada por citoquinas, tales como TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-12, IL-6 e IL-8, observándose en algunos estudios concentraciones más altas que las descritas durante la infección por *P. falciparum* (Longley et al., 2016). Las citoquinas proinflamatorias han sido implicadas en el control de la parasitemia. Se ha descrito que la eliminación del parásito, durante la infección por *P. vivax*, va depender de la presencia de células efectoras, tales como los macrófagos, los cuales eliminan los parásitos intracelulares vía óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), activándose la producción de óxido nítrico, a través de IFN-γ y TNF-α (Jain et al., 2010). Además, de la producción de IFN-γ y TNF-α, durante la infección malárica son producidas otras citoquinas, como la IL-12 e IL-18, que van actuar juntas para eliminar los parásitos. Finalmente, los episodios febriles, son causados por la liberación de agentes pirogénicos, como las citoquinas TNF-α, IL-1β e IL-6, que van actuar sobre la termorregulación corporal (Costa et al., 2018). Los resultados obtenidos indican que la infección palúdica induce la expresión de citoquinas proinflamatorias, que eliminan el parásito o promueven la eliminación de eritrocitos infectados por el mismo, en concordancia con lo descrito en la literatura.

En relación a la intensidad de expresión de IL-1A, ésta se observó disminuida con respecto al resto de las citoquinas proinflamatorias. Esto podría explicarse por el hecho de que IL-1α forma parte de un grupo de citoquinas conocidas como "Citoquinas de función dual", las cuales se caracterizan por ser expresadas de forma constitutiva, cumpliendo funciones de homeostasis en células de reposo no hematopoyéticas (Moltz, 1993), tales como células epiteliales del tracto gastrointestinal, el riñón, el hígado y los queratinocitos de la piel (Rider et al., 2013; Kong et al., 2006). Por esta razón, es posible que, al utilizar sangre total, no se encuentren presentes las principales fuentes de IL-1α.

Varios estudios sugieren que la resolución exitosa de la infección de la malaria depende de la capacidad del hospedero para inducir concentraciones adecuadas de citoquinas proinflamatorias y reguladoras durante las etapas claves de la infección. Por lo tanto, simultáneo a la respuesta inflamatoria, la infección aguda por *P. vivax* induce la expresión de citoquinas regulatorias (Hojo-Souza et al., 2017). En el presente estudio, al analizar la expresión de las citoquinas reguladoras, se observó una expresión significativamente incrementada de TGF-β. Si bien, TGF-β está incluida en el grupo de citoquinas reguladoras, estudios realizados en modelos de infección por *Plasmodium sp.* han demostrado que posee una función dual, la cual es dependiente de la concentración en el microambiente y del estadío de la infección. En los estadios más tempranos de la infección TGF-β promueve mecanismos tipo Th1, destinados a controlar el crecimiento parasitario, mientras que en los estadios tardíos inhibe tales mecanismos para limitar la patología asociada a la inflamación (Wahl, 1994). Puede decirse entonces que actúa de forma coordinada con

las citoquinas proinflamatorias en las etapas tempranas de la infección (antes de 6 días). Por esta razón, es posible que la expresión incrementada de TGF-β, observada en este estudio, está asociada con su función de controlar el crecimiento parasitario, considerando que el tiempo máximo de estimulación contemplado en el ensayo fue de 24h. Con respecto a la expresión de las citoquinas adaptativas, en el presente estudio se observó una expresión significativamente incrementada de IL-4 con respecto a IL-12.

Al establecer las comparaciones, considerando el genotipo *HP*, se observó que el grupo de individuos con genotipo homocigoto *HP1-1* y con al menos un alelo *HP1* presentaban una mayor expresión de IL-4 respecto al grupo con genotipo homocigoto *HP2-2*. De igual manera, el grupo homocigoto para el genotipo *HP2-2* mostró una expresión significativamente disminuida de IL-4 respecto al grupo con el genotipo heterocigoto *HP1-2*. Finalmente, a pesar de no hallarse una diferencia significativa, se observó que las citoquinas inflamatorias, IL-A, IL-1B, IL-6 y TNF-α, presentaron una intensidad de expresión mayor en los individuos *HP2-2* y una mayor intensidad de expresión de la citoquina TGFβ en los individuos *HP1-1*. En concordancia con lo descrito previamente, ya que macrófagos estimulados vía CD163 por complejos Hp2-2 expresan citoquinas tipo Th1, mientras que aquellos estimulados por complejos Hp1-1 expresan citoquinas tipo Th2 (Guetta et al., 2007). Después del desafío antigénico, las células T cooperadores $CD4^+$ vírgenes (Th) se diferencian hacia células Th1 o Th2, y los mecanismos involucrados en este proceso dependen de citoquinas. La IL-4 juega un papel esencial promoviendo la diferenciación a células Th2, mientras que inhibe la diferenciación de células Th1 (Zamorano et al., 2003). En contraste, la IL-12 induce a las células T CD4+ vírgenes a diferenciarse en células Th1 (Sun et al., 2015). Los linfocitos $TCD4^+$, son importantes en el control de las formas sanguíneas de la malaria mediante la producción de citoquinas. Además, las células TCD4+ y los anticuerpos son requeridos para reducir la parasitemia y mediar la eliminación de los parásitos durante la fase crónica. Al inicio de la infección las células Th1 secretan IFN-γ, que favorece la producción de óxido nítrico por los macrófagos, reduciendo la carga parasitaria, mientras que las células Th2 inducen la producción de anticuerpos IgG_1, favoreciendo la inmunidad mediada por anticuerpos, y en consecuencia la reducción de la parasitemia y la resolución de la infección latente (Taylor-Robinson et al., 1993; Fonseca et al., 2007; Carpenter et al., 2007). La presencia incrementada de IL-4 indica que el control de la parasitemia, durante la infección aguda, es dependiente de las Th2, pero estas células son requeridas durante la fase crónica de la infección para promover la respuesta de anticuerpos (Stevenson and Riley, 2004). Por lo tanto, la producción simultánea de las diferentes citoquinas, proinflamatorias y reguladoras (IL-6, TNF, IL-2, IL-10, IFN-γ e IL-4), mantendrán un equilibrio entre el control de la infección y las manifestaciones clínicas causadas por la malaria. En consecuencia, la alteración en la producción de estas citoquinas rompe este equilibrio, influyendo en la patogenia, la gravedad de la enfermedad y los episodios recurrentes de malaria por *P. vivax* (Costa et al., 2018).

Finalmente, estudios de asociación entre el polimorfismo del gen de haptoglobina y malaria han demostrado, que el genotipo de la haptoglobina puede no influir en la susceptibilidad a la infección por malaria o el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, el genotipo de la haptoglobina puede influir en el tipo de enfermedad desarrollada, por lo que los individuos Hp2-2 expresan tipos más complicados y graves de malaria (Alfred & Gwakisa, 2013). En consecuencia, la menor actividad antioxidante y el aumento de la reactividad inflamatoria del fenotipo Hp2-2 (perfil de citocinas Th1) podrían reducir la parasitemia, pero la respuesta inflamatoria (Th1) exacerbada cuando no se controla influiría en la patogenia de la enfermedad y los episodios recurrentes de malaria por *Plasmodium vivax.*

REFERENCIAS

ALFRED B, GWAKISA P. **Haptoglobin gene polymorphism influences the effect of malaria infection on host haptoglobin plasma level but not susceptibility to the disease.** African Journal of Biotechnology. 12 (10): 1115-1120. 2013.

BOWMAN BH, KUROSKY A. **Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation.** Adv Hum Genet. 12:189-261,453-454.1982.

BRADFORD, MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry. 72(1-2): 248-254.1976.

CARPENTER D, ABUSHAMA H, BERECZKY S, FÄRNERT A, Rooth I, TROYE-BLOMBERG M, Shaw MA. **Immunogenetic control of antibody responsiveness in a malaria endemic area.** Human immunology. 68(3): 165-69. 2007

COSTA AG, RAMASAWMY R, VAL FFA, IBIAPINA HNS, OLIVEIRA AC, TARRAGÔ AM, LACERDA MVG. **Polymorphisms in TLRs influence circulating cytokines production in *Plasmodium vivax* malaria: TLR polymorphisms influence cytokine productions in malaria-vivax.** Cytokine. 110: 374-380. 2018.

FONSECA L, SEIXAS E, BUTCHER G, LANGHORNE J. **Cytokine responses of CD4+ T cells during a Plasmodium chabaudi chabaudi (ER) blood-stage infection in mice initiated by the natural route of infection.** Malaria Journal. 6 (1): 77. 2007

GUETTA J, STRAUSS M, LEVY NS, FAHOUM L, LEVY AP. **Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin.** Atherosclerosis. 191(1):48–53. 2007.

HOJO-SOUZA NS, PEREIRA DB, SOUZA FSH, MENDES TAO, CARDOSO MS, TADA MS, BUENO LL. **On the cytokine/chemokine network during Plasmodium vivax malaria: new insights to understand the disease**. Malaria Journal. 16 (1), 42. 2017

HUNT NH, DRIUSSI C, SAI-KIANG L. **Haptoglobin and malaria**. Redox Report. 6 (6): 389-392. 2001.

JAIN V, SINGH PP, SILAWAT N, PATEL R, SAXENA A, BHARTI PK, SINGH N. **A preliminary study on pro-and anti-inflammatory cytokine profiles in Plasmodium vivax malaria patients from central zone of India**. Acta Tropica. 113(3): 263-268. 2010.

JANG YK, JUNG DH, JUNG MH, KIM DH, YOO KH, SUNG KW, YANG SE. **Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells.** Annals of Hematology. 85(4): 212-22. 2006.

KARUNAWEERA ND, WIJESEKERA SK, WANASEKERA D, MENDIS KN, CARTER R. **The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria**. Trends Parasitol. 19 (4):188–93. 2003.

KONG J, GRANDO SA, LI YC. **Regulation of IL-1 family cytokines IL-1alpha, IL-1 receptor antagonist, and IL-18 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary keratinocytes**. J Immunol. 176 (6):3780-7.2006.

LANGLOIS MR, DELANGHE JR. **Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans**. Clin Chem. 42(10):1589–600. 1996.

LIM SK, KIM H, LIM SK, BIN ALI A, LIM YK, WANG Y, CHONG SM, COSTANTINI F, BAUMMAN H. **Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis**. Blood. 92 (6):1870-7. 1998.

LONGLEY RJ, SATTABONGKOT J, MUELLER I. **Insights into the naturally acquired immune response to Plasmodium vivax malaria**. Parasitology. 143(2), 154-170. 2016.

MENDONÇA VRR, LUZ NF, SANTOS NJG, BORGES VM, GONÇALVES MS, ANDRADE BB, BARRAL-NETTO M. A**ssociation between the Haptoglobin and Heme Oxygenase 1 Genetic Profiles and Soluble CD163 in Susceptibility to and Severity of Human Malaria.** Infection and Immunity. 80 (4):1445-54. 2012.

MILNER DA. **Malaria Pathogenesis.** Cold Spring Harb Perspect Med. 8 (1): a025569. 2018

MOLTZ H. **Fever: causes and consequences.** Neurosci Biobehav Rev. 17 (3):237-69. 1993.

OLIVIERO S, CORTESE R. **The human haptoglobin gene promoter: interleukin-6-responsive elements interact with a DNA-binding protein induced by interleukin-6.** EMBO J. 8 (4):1145-51. 1989.

QUAYE IK. **Haptoglobin, inflammation and disease.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 102(8):735-42. 200.

RIDER P, CARMI Y, VORONOV E, APTE RN (2013). **Interleukin-1α.** Semin Immunol. 25 (6):430–8. 2013.

SADRZADEH SM, GRAF E, PANTER SS, HALLAWAY PE, EATON JW. **Hemoglobin. A biologic Fenton reagent**. J Biol Chem. 259 (23):14354-6. 1984.

SHIM BS, LEE TH, KANG YS. **Immunological and biochemical investigations of human serum haptoglobin: composition of haptoglobin–haemoglobin intermediate, haemoglobin-binding sites and presence of additional alleles for β-chain.** Nature. 207(5003): 1264-7. 1965.

STEVENSON MM, Riley EM. **Innate immunity to malaria**. Nature Reviews Immunology. 4(3): 169-80. 2004.

SUN L, HE C, NAIR L, YEUNG J, EGWUAGU CE. **Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease.** Cytokine. 75 (2): 249-255. 2015.

TAYLOR-ROBINSON AW, PHILLIPS RS, SEVERN A, MONCADA S, LIEW FY. **The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection.** Science. 260 (5116): 1931-1934.1993.

WAHL SM. **Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly.** J Exp Med. 180(5):1587-90. 1994.

WIDE A, NOYA O, CAPALDO J, PABÓN R. **Fundamentos Diagnóstico y Control Malaria - SOS.** Instituto de Altos Estudios, Dr. Arnoldo Gabaldón MPPS. 2011.

WHO. **World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges**. 2020

ZAMORANO J, RIVAS MD, PEREZ G. **Interleukin-4: A multifunctional cytokine**. Inmunología, 22 (2): 215-224. 2003.

CAPÍTULO 2

GIARDIA SPP. IN FREE-RANGING INTRODUCED MONK PARAKEETS AND ITS DISTRIBUTION IN SANTIAGO METROPOLIS, CHILE

Data de aceite: 01/11/2021

Alejandra Sandoval-Rodríguez
Programa de Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias, Campus Sur Universidad de Chile
Animal Preventive Medicine Department, Faculty of Animal and Veterinary Sciences, University of Chile
Santa Rosa 11315, La Pintana, Santiago, Chile
CP: 8820808

Daniela Marcone
Animal Preventive Medicine Department, Faculty of Animal and Veterinary Sciences
University of Chile
Santiago, Chile

Raúl Alegría-Morán
Animal Preventive Medicine Department, Faculty of Animal and Veterinary Sciences
University of Chile
Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Pedro de Valdivia University
Santiago, Chile

Matilde Larraechea
Animal Preventive Medicine Department, Faculty of Animal and Veterinary Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

Karina Yévenes
Animal Preventive Medicine Department, Faculty of Animal and Veterinary Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

Fernando Fredes
Animal Preventive Medicine Department, Faculty of Animal and Veterinary Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

Cristóbal Briceño
Animal Preventive Medicine Department, Faculty of Animal and Veterinary Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

RESUMO: O periquito-monge (Myiopsitta monachus) é uma espécie de psitacídeo que, devido aos seus interesses como animal de estimação, tornou-se popular no comércio global de animais e atualmente invade cerca de 20 países em todo o mundo. Nos últimos cinquenta anos, os periquitos-monge se desenvolveram como uma ave invasora na metrópole de Santiago, Chile. Pouco se sabe sobre seu impacto, mas evidências recentes sugerem que seu papel como engenheiro de ecossistemas é relevante, em particular no que diz respeito a parasitas. Giardia spp. é um parasita gastrointestinal cosmopolita cujos hospedeiros potenciais incluem pássaros e humanos. Aqui, relatamos a presença desse patógeno em periquitos-monges da área urbana de Santiago. Durante os verões austral de 2017 e 2018, 207 filhotes de periquito-monge foram capturados e o conteúdo fecal estudado por meio de análises microscópicas. Dados ambientais relacionados às áreas onde os filhotes foram capturados foram analisados para estabelecer a existência de agrupamentos de infecção. Foram exploradas

associações entre agrupamentos espaciais, variáveis ambientais e a presença ou ausência desse patógeno. Em suma, 25 (12%) amostras foram positivas para Giardia spp. cistos. Os resultados sugerem que as árvores podadas podem ser um fator protetor contra a infecção por esse parasita. Este estudo contribui para a compreensão das implicações para a saúde da invasão do periquito-monge e seu papel potencial como reservatório e disseminador de parasitas em ambientes urbanos.
PALAVRAS-CHAVE: Giardia; invasive species; monk parakeet; Myiopsitta monachus; One Health; parasites; protozoa; synanthropic species; zoonoses

ABSTRACT: The monk parakeet (*Myiopsitta monachus*) is a psittacid species that due its interests as a pet, became popular in global animal trade and currently invades some 20 countries globally. Over the last fifty years monk parakeets have thrived as an invasive bird in Santiago metropolis, Chile. Little is known about their impact, but recent evidence suggests their role as ecosystem engineer is relevant, in particular in regard to parasites. *Giardia* spp. is a cosmopolitan gastrointestinal parasite whose potential hosts include birds and humans. Here, we report the presence of this pathogen in monk parakeets from urban Santiago. During the austral summers of 2017 and 2018, 207 monk parakeet nestlings were captured and fecal content studied via microscopical analyses. Environmental data related to areas were nestlings were captured was analyzed to establish the existence of infection clusters. Associations between spatial clusters, environmental variables and the presence or absence of this pathogen was explored. In sum, 25 (12%) samples were positive to *Giardia* spp. cysts. Results suggests that pruned trees may be a protective factor against infection with this parasite. This study contributes to understanding health implications of monk parakeet invasion, and their potential role as a reservoir and parasitic disseminator in urban environments.
KEYWORDS: Giardia; invasive species; monk parakeet; *Myiopsitta monachus*; One Health; parasites; protozoa; synanthropic species; zoonoses.

1 I INTRODUCTION

Biological invasions are recognized as a major cause of biodiversity loss (Dunn and Hatcher, 2015; Mooney and Cleland, 2001; Vitousek *et al.*, 1997). They have been linked to the emergence of diseases in native populations and, recently, acknowledged as relevant factors contributing to the spread of zoonoses (Briceño *et al.*, 2017; Briceño et al., 2021; Estrada-Peña *et al.*, 2014; Hulme, 2014).

Monk parakeets (*Myiopsitta monachus*) are gregarious medium-sized psittacids naturally distributed in Paraguay, Uruguay, Bolivia, southern Brazil, and northern and central Argentina. However, due to the international pet trade this bird became invasive in some 20 countries of Africa, Asia, Europe, and America (Eberhard, 1998; Edelaar *et al.*, 2015; GISD, 2020; South and Pruett-Jones, 2000).

Monk parakeets are considered one of the most successful invasive bird species given their particular behaviour and ecology (Sol *et al.*, 1997; Strubbe and Matthysen, 2009;

Van Ham *et al.,* 2013). Their great reproductive capacity and ability to prosper in novel environments can be attributed to their reproductive, nesting, and dietary habits (Borray-Escalante *et al*., 2020; Bucher and Aramburú, 2014; Eberhard, 1998; Sol *et al*., 1997; Senar *et al*., 2019; South and Pruett-Jones, 2000; Strubbe and Matthysen, 2009; Viana *et al*., 2016). This includes their unique ability among psittacids to entwine their own communal nests with twigs and branches, and their condition of ecosystem engineers (Briceño *et al*., 2019; Spreyer and Bucher, 1998).

Several negative impacts are associated to the presence of monk parakeets, both in countries where they are native and in countries they have invaded (Bucher and Aramburú, 2014; Viana *et al*., 2016). These impacts are often associated to economic losses derived from monk parakeet's activity (Conroy and Senar, 2009). Parakeets may utilize human structures such as electric posts to build their nests, which can lead to power outages (Viana *et al*., 2016). Their generalist diet often results in considerable economical costs for agricultural fields (Van Ham *et al*., 2013). For instance, in Argentina these birds cause losses of up to 1 billion dollars every year due to crop damage (Iriarte *et al*., 2005). Studies on monk parakeets have mainly focused on its economic impact or ecological traits, though their sanitary condition has been less concerned (Briceño *et al*. 2017). It is only recently that the presence of pathogens such as the Beak and Feather Disease Virus and the parasite Leucocytozoon have been described in monk parakeets from southern Spain (Martínez-de la Puente *et al*., 2020; Morinha *et al*., 2020). Further, zoonotic parasite *Ornithonyssus bursa* has been detected in monk parakeets, in their native and introduced distributions (Ancillotto *et al*., 2018; Aramburú *et* al., 2002; Briceño *et al*., 2021).

Monk parakeets were introduced in Chile in the early 1970's, when parakeets were released in the north-east area of Santiago, from where they started to spread to the rest of the territory (Briceño *et al*., 2019). Nowadays, monk parakeets are considered to be one of the most harmful species of invasive birds in Chile, due to their negative impact associated to agricultural, fruit and ornamental trees (Briceño *et al*., 2017). Despite this, not much research has been conducted to establish the real impact of monk parakeets as an invasive species in Chile (Briceño *et al*., 2017).

Recently, the presence of *Cryptosporidium* spp. in fecal samples from Monk Parakeets captured in Northeast Santiago, Chile, was reported (Briceño *et al*., 2017). A second report described interactions between monk parakeets and other bird species in Santiago, Chile, revealing that parakeets and other species of birds can coexist pacifically (Briceño *et al*., 2019). This study showed that, as observed in other countries (Di Santo *et al*., 2017), other bird species make use of monk parakeet nests for breeding, evidencing the role of monk parakeets as ecosystem engineers (Briceño *et al*., 2019). *Cryptosporidium* spp. often coexists with *Giardia* spp., another gastrointestinal parasite. Both parasites are transmitted via orofecal route by ingestion of water or food contaminated with (oo) cysts (Han *et al*., 2020; Ludwig and Marques, 2011; Xiao and Fayer, 2008). Although

infections with these parasites can be asymptomatic or produce imperceptible clinical signs, immunocompromised individuals can eventually become sick and exhibit symptoms such as diarrhea, abdominal pain, nausea, vomit, and fever (Domingos et al., 2017; Ravish *et al.*, 2014). *Giardia* spp. can be detected and isolated in the environment, being contaminated water sources one of the main sources of contagion (Han *et al.*, 2020; Xiao and Fayer, 2008). *Giardia* spp. has also been detected in soil samples from public parks in Madrid, Spain (Dado *et al.*, 2012a).

Giardiasis is considered to be a neglected disease by the World Health Organization (Savioli *et al.*, 2006). This is of importance since *Giardia* spp. infections primarily occur in developing countries where infection outcomes can be influenced by factors such as poverty and lack of access to appropriate resources. Disease by this pathogen can impede the proper physical and socio-economic development of those affected by them (Savioli *et al.*, 2006). It is important from a one health perspective, due to the interdependence of human, animal and environmental health (Osburn *et al.*, 2009; Zinsstag *et al.*, 2011).

Considering that biological invasions can be a source of pathogens, some of them zoonotic, and can thus, eventually affect the health of people (Estrada-Peña *et al.*, 2014; Hatcher *et al.*, 2012; Keesing *et al.*, 2010; Thompson, 2013), and that monk parakeets are synanthropic birds, keeping a close contact with human populations by building their nests within urban public squares and parks (Briceño *et al.*, 2019; Di Santo *et al.*, 2017), investigating the sanitary state of these invasive birds becomes important. Therefore, the aim of this study was to perform a thorough inquest into the occurrence of *Giardia* spp. within free ranging monk parakeets located in Santiago. We additionally sought to determine the existence of infection clusters within the city, and to study the correlation between environmental variables associated to the trees in which monk parakeets nest and positive rates of infection.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 Study area

The sampling area compromised twenty-one municipalities of Santiago (33º27' S; 70º38' W), the capital city of Chile. Santiago is located in the Metropolitan Region in Central Chile, a Mediterranean bioclimatic zone defined by dry summers, wet winters, and interannual variability caused by the El Niño-Southern Oscillation phenomenon (Amigo and Ramírez, 1998). Mean annual temperature is 13.2 ºC and mean annual precipitation is 531 mm (Schulz *et al.*, 2010). Vegetation occurs in an assortment of *Acacia caven* shrubland on lower hillslopes, and evergreen sclerophyllous forest on watersheds and south-facing slopes (Badano *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2010). The Metropolitan Region is currently divided into 52 municipalities and is the highest densely populated region in the country,

concentrating 40% of the national population with 7,112,808 inhabitants and a density of 462 people/km^2 (INE, 2021). Due to its accelerated and unorganized expansion, Santiago is characterized by urban sprawl and deep environmental degradation (Silva, 2015). Green areas within the city are highly stratified, from a total of 3,825 ha, 62% (2,387 ha) are distributed in only 3% of the total green areas. These areas are associated to large public parks (Reyes and Figueroa, 2010).

2.2 Study species

Monk parakeets (*Myiopsitta monachus*) are medium-sized sexually monomorphic parrots originally distributed in the south-eastern area of South America, specifically in Paraguay, Uruguay, Bolivia, southern Brazil, and northern and central Argentina (Eberhard, 1998; Olrog, 1968). As a consequence of the international pet trade monk parakeets have been introduced into several countries, becoming an invasive species at least in 19 countries of Africa, Asia, Europe, and America, including Chile (Eberhard, 1998; Edelaar *et al*., 2015; GISD, 2020; South and Pruett-Jones, 2000). This invasive success can be attributed to several behavioral and ecological traits. More notably, monk parakeets are the only species among the order Psittaciformes that does not rely on preexisting cavities to nest, since they are able to build their own communal nests (Martin and Bucher, 1993; South and Pruett-Jones, 2000; Viana *et al*., 2016). Furthermore, they feed on a flexible diet, allowing them to exploit a wide variety of fruits and seeds (Borray-Escalante *et al*., 2020). Additionally, their gregarious behavior leads them to engage in communal parenting increasing their possibilities to avoid predatory attacks (Eberhard, 1998; South and Pruett-Jones, 2000; Viana *et al*., 2016). Ultimately, they display great tolerance to human presence and urban perturbations, often building their nests in public squares and parks (Briceño *et al*., 2019; South and Pruett-Jones, 2000; Sol *et al*., 1997; Strubbe and Matthysen, 2009). All these traits provide a great capacity to adapt to different environments and lead to an accelerated population growth (Bucher and Aramburú, 2014; Strubbe and Matthysen, 2009). Further, their reproductive success seems to be higher in introduced versus native distributions (Senar *et al*., 2019). Finally, their condition of ecosystem engineers places them in a particular invasive category of concern (Briceño *et al*., 2019).

2.3 Nestling sampling and processing

Sampling took place during the Austral monk parakeet's breeding season; November and December of 2017 and 2018. Twenty-one municipalities of Santiago, Chile were opportunistically sampled for the study (Figure 1). Monk parakeet nestlings were considered as the sample unit and were assumed to represent the nest inhabitants' sanitary condition. Nestlings were manually counted and captured from their nest and accessed through a hydraulic aerial platform. Only one individual was captured *per* nest and *per* tree.
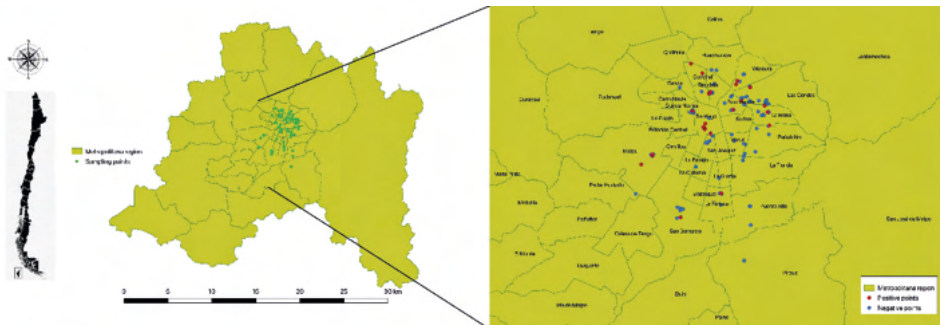
Figure 1. Sampled area within the city of Santiago metropolis, Chile. Red points represent positive samples and blue points negative samples.

Since parakeet sampling depended upon the number of trees with occupied nests *per* municipality, accessibility to nests, technical support provided by each municipality and daily possibilities to sample, among others, the sampling process was of convenience.

Nestlings were sacrificed via cervical dislocation following bioethical protocols. During the necropsy, individuals were aged and the distal portion of the digestive tract and its content was sectioned and preserved in 70% ethanol at 4°C, until further analyses. All procedures were conducted in compliance with national regulations established by Servicio Agrícola y Ganadero (SAG, Chilean Fish and Wildlife Service), under permit No. 716/2016, and bioethical and biosafety protocols issued by the Faculty of Animal Veterinary Sciences, University of Chile (Bioethical approval No. 19-2016 and Biosafety approval No. 82).

2.4 Protozoa detection

Fecal content was extracted from the preserved digestive tract for macroscopic and microscopic parasitological analyses. *Giardia* spp. cysts were detected by means of modified Telemann method using lugol's stain and 100 μL of sediment extended onto a 1 cm x 0,5 cm slide (Atías, 1998).

2.5 Environmental variables

For each nestling sample, the following environmental data related to the tree in which it was captured were recorded: municipality in which it was located, tree species, sanitary state of the tree (healthy/not healthy), tree management (pruned/not pruned), tree height, tree canopy diameter, diameter at breast height (DBH), number of nests per tree, nest size, nest height, number of chambers per nest, number of nestlings per nest, and GPS coordinates. Tree canopy diameter and DBH were measured using a 30 m. measuring tape while tree height and nest height were measured using a hypsometer. Health condition of trees was determined with the collaboration of academics at the Faculty of Forestry Sciences at the University of Chile.

2.6 Statistical analyses

Descriptive statistic was performed to summarize each recorded variable. Considering the nature of the collected data (positivity to *Giardia* spp. cysts) a logistic regression model analysis was performed (Dohoo *et al*. 2009). Univariate logistic regression analyses were performed to assess the relationship between all recorded variables and the positivity to the pathogen. Spearman correlation, Pearson chi-square and Fisher's exact test were performed to assess for collinearity and potential confounding factors, setting significance on $p < 0.05$. Variables with a P-value ≤ 0.25 were included in a multivariable logistic regression model (liberal criteria). A stepwise backward elimination procedure was conducted, using the log Likelihood Ratio Test (LRT); the model with the lowest LRT was selected as the final model (in the three built models). Likewise, variables whose regression coefficients were not significant ($P > 0.05$) were removed from the multivariable logistic regression (Kleinbaum and Klein, 2010). Non-significant variables, which produced a change greater than 20% in the regression coefficients of the significant variables when removed, were retained in the model to adjust for confounding factors. All the biologically feasible interaction variables were included in the model design (Dohoo *et al*. 2009). The convergence of the models was set at a value of epsilon = e^{-16} in order to increase restrictions on models and to secure the representativity and power of results. Goodness-of-fit of the final model was evaluated using the Hosmer and Lemeshow Test (Hosmer *et al*., 1997).

Biologically logical interactions between variables that fulfilled the liberal criteria were also analyzed. All categorical variables were analyzed using the dummy variables approach (Kuiper, 2008). Local clustering of positive samples was assessed by means of the Bernoulli model of the spatial scan statistic, considering a purely spatial cluster analysis (Kulldorf, 1997; Kulldorf and Nagarwalla, 1995). Analyses were conducted using the RStudio and the statistical software R 3.3.1 (R Core Team, 2016) plus 'lme4', 'ggplot2' and 'gcookbook' packages, and SatScan software version 9.4.2. (Kulldorff, 2009). Odds ratio, 95% confidence interval and P-value were computed.

Finally, statistically significant differences between sampling years were determined by calculating the prevalence difference, equivalent to an attributable risk or excess risk, and 95% confidence intervals, based on approximation and null hypothesis testing (prevalence difference equals to 0) (Rothman, 2012). This analysis was performed using R version 3.6.1 (R Core Team, 2016) and "fmsb" package (Nakazawa, 2019).

3 | RESULTS

3.1 Protozoa detection

A total of 207 monk parakeet nestlings were captured during the sampling period, 98 in 2017 and 109 in 2018, and a subsequent total of 207 stool samples were analyzed.

Total number of positive samples *per* parasite and per municipality can be seen in Table 1. Out of the 207 stool samples 25 were positive to the presence of *Giardia* spp. cysts (Figure 2). Positivity to *Giardia* spp. was of 10.2% in 2017 (10/98) and 13.8% in 2018 (15/109). Overall, individuals that were positive to *Giardia* spp. presented one to five cysts detected by microscopy per 100 μL of analyzed sample.

The presence of other parasites such as helminths and other protozoa was discarded via microscopical observation during the modified Telemann exam.

Municipality	**Total number of analyzed samples**	***Giardia* spp. positive samples**
Conchalí	5	3
Huechuraba	4	0
Recoleta	20	2
Vitacura	8	2
Las Condes	22	1
Providencia	12	2
La Reina	37	2
Macul	5	0
San Bernardo	12	1
Peñalolen	13	1
Maipú	13	3
Puente Alto	5	0
La Granja	4	0
La Cisterna	1	0
Santiago	24	7
La Florida	3	0
San Miguel	9	0
La Pintana	5	1
Independencia	1	0
Pirque	3	0
Renca	1	0
TOTAL	207	**25**

Table 1. Number of positive parakeets to *Giardia* spp. per municipality.
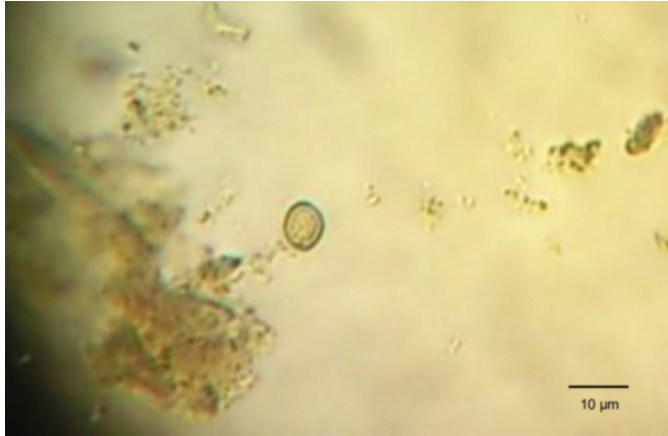
Figure 2. Microscopical image of intestinal content of monk parakeets: *Giardia* spp. cyst detected via Telemann method and stained using an iodine solution (400X).

3.2 Environmental variable analyses

Sample records for each nestling were analyzed. Models for *Giardia* spp. show a significant role of pruning trees as a protective factor (OR = 0.25, 95% CI LL = 0.09 and UL = 0.71; *P* = 0.01). Nest height also showed a borderline significance (*P* = 0.07), but the OR and 95% CI show a non-causal association (Table 2). Finally, the number of nestlings per nest exhibited a significant positive association to *Giardia* spp. infection (OR = 1.59, 95% CI LL = 1.17 and UL = 2.17; *P* = 0.003). Spearman correlation, Chi-square and Fisher's exact test results shows no collinearity and potential confounding factors among the variables included in the multivariable logistic regression models (p > 0.05).

Variable	***P*-value**	**OR**	**95% CI**	
			Lower limit	**Upper limit**
(Intercept)	<0.001	-	-	-
Number of nestlings per nest	0.003	1.59	1.17	2.17
Nest height	0.07	0.99	0.99	1.00
Pruning	0.01	0.25	0.09	0.71

Table 2. Results from the multivariate logistic regression analysis. Categories, *P*-value, odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) lower and upper limit are reported for the variables that were retained in the model showing an association or relevance on the positivity to *Giardia* spp. on monk parakeet samples.

3.3 Spatial analyses

All 25 *Giardia* spp. positive samples were distributed throughout the study area. The Bernoulli model of the spatial scan statistic detected several clusters, none of them

significant. Only one of them, a cluster for *Giardia* spp., presented borderline significance (*P* = 0.06). This cluster included nine sample points in a radius of 1.26 km, with a relative risk of 6.95, indicating a high risk of positivity at this site, located at Santiago, San Miguel and San Joaquin municipalities.

3.4 Sampling season analysis

Prevalence values showed no statistically significant differences ($p < 0.05$) for *Giardia* spp. in regard to sampling years (Table 3).

Parasite	2017		2018		*P-value*	95% Difference CI	
	Positive samples	n	Positive samples	n		Lower	Upper
Giardia spp.	10	98	15	109	0.568	-0.133	0.062

Table 3. Number of positive samples, p-value and 95% CI of prevalence differences to *Giardia* spp. between sampling seasons, obtained from introduced monk parakeets in Santiago, Chile.

4 I DISCUSSION

Even though introduced monk parakeets have been inhabiting Chile for almost 50 years, not much is known about the local impact of this invasive bird (Briceño *et al*., 2017; Briceño *et al*., 2019). This study detected the presence of *Giardia* spp. in intestinal samples of monk parakeets from urban Santiago, and identified a possible protective factor associated to the absence of infection with this parasite.

Monk parakeet nestlings rely completely on their parents for feeding and do not leave the nest until they reach approximately 40 days of age (Aramburú, 1997). Considering that G*iardia* spp. is an orofecally transmitted parasite (Ludwig and Marques, 2011), that monk parakeets are gregarious animals that live in communal nests where they maintain close contact and practice collaborative parenting, and that they defecate within these nests (Eberhard, 1998; South and Pruett-Jones, 2000; Viana *et al*., 2016), it is highly likely that nestlings acquired this pathogen by being in close contact with infected adult individuals or through their feces.

Detection of *Giardia* spp. in monk parakeet's fecal samples is of relevance, as this widely distributed gastrointestinal parasite, possesses great zoonotic potential exhibiting a wide range and variety of potential hosts that include mammals, fish, amphibians, reptiles, and birds (Berrilli *et al*., 2011; Evans, 2011; Fialho *et al*., 2008; Ludwig and Marques, 2011; Molina *et al*., 2006; Nakamura and Meireles, 2015; Zhang *et al*., 2012).

When studying the association between presence of this pathogen and environmental variables recorded at monk parakeet's nesting sites, it was possible to observe a negative association between parasite detection and pruned trees. This could indicate that pruned

managed trees might constitute a protective factor against *Giardia* spp. infections. Considering that pruning is of great importance when it comes to maintenance of tree health (Badrulhisham and Othman, 2016), it is possible that this activity helps creating a less suitable environment for the survival of cysts in parakeet nests and surroundings, and therefore reducing the risk of infection. One way pruning trees could be contributing to lower infection rates is by allowing for higher U.V. light penetration towards nests. Another factor that could potentially be influencing this finding is pruning season. If trees are pruned during the winter season and some nests are destroyed during the process, it could be possible that some of the nests sampled during Monk Parakeet's breading season (spring and summer) corresponded to recently built structures. Due their novelty, new nests could present lower loads of accumulated cyst, which could translate into lower risk of infection.

Interestingly, a statistically significant positive association between the number of nestlings per nest and presence of *Giardia* spp. was observed. Further investigation is warranted to determine if these findings are associated to specific environmental variables or are casual results, consequence of the sampling limitations of the present study.

Due to the lack of statistical significance associated to the existence of infection clusters, it was not possible to confirm an association between the occurrence of infection with this agent and a specific geographic area within the study site. Nonetheless, a borderline significant cluster was detected in the central area of the city, compromising the municipalities of Santiago, San Miguel and San Joaquin. Further analyses would be required to confirm the existence of this cluster and to determine the factors underlying its existence.

Monk parakeets were introduced in Chile during the early 1970s as fueled by the international pet trade market (Iriarte *et al*., 2005). It is unknown if parakeets carried this pathogen upon their arrival, or whether they acquired them in Chile. No reports of this agent existing within Monk Parakeets in their original distribution range have been issued and although several endoparasitic studies have been performed on different Chilean birds (Fernández *et al*., 1996; González-Acuña *et al*., 2007; González-Acuña *et al*., 2011a; González-Acuña *et al*., 2011b; González-Hein, 2006), and more specifically on birds located in the city of Santiago (Toro *et al*., 1999), only *Cryptosporidium* spp. has so far been reported in Monk Parakeets (Briceño *et al*., 2017). As previously mentioned, nestlings most likely became infected via contact with adult individuals, which in turn may have acquired the pathogens from the surrounding environment. Infection with *Giardia* spp. is most commonly associated to the consumption of water contaminated with cysts (Han *et al*., 2020; Ludwig and Marques, 2011; Xiao and Fayer, 2008). Further studies should evaluate the quality of water sources present in public parks and squares. Interestingly, *Giardia* spp. was detected in soil samples from public parks in Spain (Dado *et al*., 2012a), evidencing the importance of this substrate as a potential additional source of pathogens.

A different factor that could possibly be contributing to the presence of this parasite

in monk parakeets relates to the coexistence of these birds and other domestic animals in public squares or parks. A study performed in 2012 detected the presence of *Giardia* spp. in fecal samples of dogs that were collected in public squares of the city of Santiago, Chile (Pastenes, 2015). A similar study conducted in Spain also detected the presence of *Giardia* spp. in fecal samples collected in public parks of Madrid (Dado *et al*., 2012a). A second investigation, also in Madrid (Spain), detected the presence of *Giardia duodenalis* in dogs from an animal shelter (Dado *et al*., 2012b). This is a relevant finding since *G. duodenalis* has been previously described in aquatic birds (Plutzer and Tomor, 2009) and has been isolated from a parrot (McDonnell *et al*., 2003). Considering that in Santiago monk parakeets make use of same type of environments to nest than dogs and, most importantly, to forage (Briceño *et al*., 2019), the possibility of this agent being transmitted back and forth between parakeets and other species is possible. This also opens the possibility of monk parakeets being infected with other species of endoparasites and would also explain the general ubiquity of these protozoa in the studied area. This possibility is supported by the previous detection of *Cryptosporidium* spp. oocyst in monk parakeets from Northeast Santiago, Chile (Briceño *et al*., 2017). Lastly, the possibility of Monk Parakeets contracting these pathogens from other bird species with which they share a common niche should also be considered, as it has been reported that monk parakeets in Santiago are able to peacefully forage and share space with other birds (Briceño *et al*., 2019).

Interestingly, other species of birds make use of parakeet's nests (Briceño *et al*., 2019; Di Santo et al., 2017). Such occurrence was recently registered in Santiago of Chile, where nine different species of birds, including rock doves and seven native species, were detected nesting inside monk parakeet's nests (Briceño *et al*., 2019). Monk parakeets often abandon their nest constructions in order to build new ones (Bucher *et al*., 1991). Additionally, incidents in which other birds attack monk parakeets, expel them from their nest and later proceed to occupy it have been registered previously (Wagner, 2012), and instances in which other bird species have been observed using empty chambers of parakeet nests that are otherwise still being occupied by parakeets have also been documented in Chile and other countries (Briceño *et al*., 2019; Eberhard, 1998). Regardless of whether monk parakeets abandon their nests voluntarily, are expelled from them, or share them, the sanitary implications of finding other birds inside these structures should not be overlooked. Coexistence in nesting sites, can eventually increase the transmission of parasites and diseases between different species (Myczko *et al*., 2016). *Giardia* spp. is an orofecally transmitted parasite (Ludwig and Marques, 2011), and considering that monk parakeets defecate within their nests (Viana *et al*., 2016), it is quite possible that bird species using abandoned parakeet's nests or making use of unoccupied chambers while parakeets still remain in the nest, could eventually acquire this, and other pathogenic agents, especially given that this protozoa may stay viable for weeks (Olson *et al*., 1999). Monk parakeets could also be spreading this parasite to other animals when being

consumed by predators. American kestrel (*Falco sparverius*) and Harri's hawk (*Parabuteo unicinctus*) have been reported as parakeet predators in Chile (Briceño *et al*., 2019; Celis-Diez, 2014). Recently, the role of monk parakeets as potential ecosystem engineers, providing a novel nesting resource in urban areas was determined (Briceño *et al*., 2019). The present report shows that their role as ecosystem engineers could extend beyond the addition of a new nesting resources and include the potential role of monk parakeets as pathogens disseminators. This is supported by recent findings in Spain where monk parakeets were found to be infected with the Beak and Feather Disease Virus and the parasite Leucocytozoon (Morinha *et al*., 2020; Martínez de la Puente *et al*., 2020).

As a synanthropic species, this may be of high health impact, in case this parasite is of zoonotic nature, representing a major risk upon urbanized metropolises as Santiago, were these parakeets seem to be successful invaders. Further, monk parakeet pathogen transmission risk is increased as this species tend to be favored by the public and are coveted as pets. In 2014, a domiciliary outbreak of psittacosis in the city of Dom Pedrito (Rio Grande do Sul State, Brazil) was attributed to monk parakeets, after eight members of a family presented psittacosis associated symptoms. Two parakeets illegally purchased by this family were identified as the source of *Chlamydophila* spp. (Freitas *et al*., 2014). Incidents such as this could eventually increase and include the transmission of other pathogens.

For the time being monk parakeets have remained confined to urban environments, but if they reach rural areas, they could eventually encounter native Chilean parrots and transmit pathogens to them or to other bird species (e.g., Beak and feather disease). This possibility is supported by a recent report issued in Spain that describes how monk parakeets from Madrid have spread into rural areas where they have been detected nesting in association to white storks (*Ciconia ciconia*). This type of behavior could allow parakeets to increase their invasive potential by avoiding biotic resistance in the form of predator pressure for example (Hernández-Brito *et al*., 2020). Although white storks are not present in Chile, parakeets could eventually benefit from the presence of other bird species and expand their range of distribution.

Current environmental variations associated to climate change and agricultural land use can, generally, be positively associated with higher risks of contagion with *Giardia* spp. (Lal *et al.*, 2013). In addition to that, since infection can occur by consumption of contaminated water, control efforts for this pathogen usually focus on the sanitary management of water sources (Collinet-Adler and Ward, 2010). The present findings could contribute to highlight the importance of biological invasions in the emergence and control of diseases, especially those of urban densely populated areas.

It must be noted that, despite exhibiting a wide variety of potential hosts, the *Giardia* genus contain many different species and genotypes that differ in their ability to infect specific host species. This translates in a high level of species-specific infections. Since

the identification of the parasites detected in this study was restricted to the genus identity of the pathogens, further analyses should be performed in order to determine the specific species infecting monk parakeets from the city of Santiago. Determining the species -and the genotypes- of the *Giardia* spp. cysts found in this study could help assessing the real potential of these birds as possible transmitters of zoonotic agents to human and animal populations.

It should also be considered that, even though the detection of *Giardia* spp. is important and the finding of pruned trees as a possible protective factor is interesting, further studies should be conducted in order to draw proper ecological and epidemiological conclusions about the presence of this pathogen and the environmental factors that influence their presence or absence. The sampling process carried out in this study was one of convenience, meaning that, several arbitrary factors influenced the selection of the sampled trees. These ranged from, nest accessibility, to time and resources availability, to permits granted by municipalities. For this reason, even though the statistical analyses performed in this work can reflect reality, they should still be considered with caution. Future studies on the sanitary state of monk parakeets should aim at a more thorough sampling design, ideally with a larger sample size or using a random sampling process, not influenced by the previously mentioned factors.

5 I CONCLUSIONS

This study reports presence of *Giardia* spp. in free-ranging parakeets from Santiago. Further studies focused on determining the specific identity of this protozoa, the presence of other pathogens in this invasive bird and the existence of environmental variables favoring or impeding infections are of great importance. As an ecosystem engineer this invader may by affecting the health of native birds in central Chile, but also represents a risk of pathogen transmission to human beings. Further studies should aim to assess these health risks at this Mediterranean ecosystem, one of the biodiversity hotspots for conservation priority (Myers *et al*., 2000).

REFERENCES

Amigo, J.; Ramírez, C. A Bioclimatic Classification of Chile: Woodland Communities in the Temperate Zone. *Plant Ecol*. 1998, 136, 9–26.

Ancillotto L, Studer V, Howard T, Smith VS, McAlister E, Beccaloni J, et al. Environmental drivers of parasite load and species richness in introduced parakeets in an urban landscape. *Parasitol Res.* 2018, 117,11, 3591-3599.

Aramburú, R. Descripción y desarrollo del pichón de la cotorra *Myiopsitta monachus monachus* (Aves: Psittacidae) en una población silvestre de Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 1997, 70, 53–58**.**

Aramburú R, Cicchino A, Bucher E. Material Vegetal Fresco En Cámaras De Cría De La Cotorra Argentina *Myiopsitta monachus* (Psittacidae). Ornitol Neotrop 2002; 13(4): 433-436.

Atías A. Parasitología Médica. 1st ed. Mediterráneo: Santiago, Chile. 1998.

Badano, E.I.; Cavieres, L.A.; Molina-Montenegro, M.A.; Quiroz, C.L. Slope aspect influences plant association patterns in the Mediterranean matorral of central Chile. *J. Arid Environ*. 2005, 62, 93–108.

Badrulhisham, N.; Othman, N. Knowledge in Tree Pruning for Sustainable Practices in Urban Setting: Improving our quality of life. *Procedia Soc Behav Sci*. 2016, 234, 210–217.

Berrilli, F.; Prisco, C.; Friedrich, K.; Di Cerbo, P.; Di Cave, D.; De Liberato, D. *Giardia duodenalis* assemblages and Entamoeba species infecting non-human primates in an Italian zoological garden: zoonotic potential and management traits. *Parasites Vectors.* 2011, 4, 1–8.

Borray-Escalante, N.A.; Mazzoni, D.; Ortega-Segalerva, A.; Arroyo, L.; Morera-Pujol, V.; González-Solís, J.; Senar, J.C. Diet assessments as a tool to control invasive species: comparison between Monk and Rose-ringed parakeets with stable isotopes. *J. Urban Ecol*. 2020, 6, 1–8.

Briceño, C.; Yévenes, K.; Larraechea, M.; Sandoval-Rodríguez, A.; Silva-de la Fuente, M.C.; Fredes, F.; Hidalgo, H.; Alcayaga, V.; Oyarzún-Ruíz, P.; Munita, C.; González-Acuña, D. First record of *Ornithonyssus bursa* (Berlese, 1888; Mesostigmata: Macronyssidae) parasitizing invasive monk parakeets in Santiago, Chile. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 2021, 30, 1.

Briceño, C.; Sandoval-Rodríguez, A.; Yévenes, K.; Larraechea, M.; Morgado, A.; Chappuzeau, C.; Muñoz, V.; Dufflocq, P.; Olivares, F. Interactions between invasive Monk Parakeets (*Myiopsitta monachus*) and other bird species during nesting seasons in Santiago, Chile. *Animals*, 2019, 9, 1–13.

Briceño, C.; Surot, D.; González-Acuña, D.; Martínez, F.J.; Fredes, F. Parasitic survey on introduced Monk Parakeets (Myiopsitta monachus) in Santiago, Chile. Rev Bras Parasitol Vet. 2017, 26, 129–135.

Bucher, E.H.; Aramburú, R.M. Land-use changes and Monk Parakeet expansion in the pampas grasslands of Argentina. *J. Biogeogr*. 2014, 41, 1160–1170.

Bucher, E.; Martin, L.; Martella, M.; Navarro, J. Social behaviour and population dynamics of the Monk Parakeet. Acta XX Congressus Internationalis Ornithologici II. 1991; 681–689.

Celis-Diez, J.L. Observations on American Kestrels (*Falco sparverius*) predating on Monk Parakeet chicks (*Myiopsitta monachus*) at urban parks in Santiago. *Boletín Chil. Ornitol*. 2014, 20, 23–24.

Collinet-Adler, S.; Ward, H.D. Cryptosporidiosis: Environmental, therapeutic, and preventive challenges. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2010, 29, 927–935.

Conroy, M.J.; Senar, J.C. Integration of Demographic Analyses and Decision Modeling in Support of Management of Invasive Monk Parakeets, an Urban and Agricultural Pest. In *Modeling Demographic Processes In Marked Populations. Environmental and Ecological Statistics*. Thomson, D.L., Cooch, E.G., Conroy, M.J., Eds.; Springer: Boston, MA, United States, 2009, Volume 3, pp. 491–510.

Dado, D.; Izquierdo, F.; Vera, O.; Montoya, A.; Mateo, M.; Fenoy, S.; Galván, A.L.; García, S.; García, A.; Aránguez, E.; López, L.; del Águila, C.; Miro, G. Detection of Zoonotic Intestinal Parasites in Public Parks of Spain. *Potential Epidemiological Role of Microsporidia. Zoonoses Public Health*, 2012a, 59, 23–28.

Dado, D.; Montoya, A.; Blanco, M.A.; Miró, G.; Saugar, J.M.; Bailo, B.; Fuentes, I. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* from dogs in Spain: possible zoonotic transmission and public health importance. *Parasitol. Res.* 2012b, 111, 2419–2422.

Di Santo, M.; Battisti, C.; Bologna, M.A. Interspecific interactions in nesting and feeding urban sites among introduced Monk Parakeet (*Myiopsitta monachus*) and syntopic bird species. *Ethol. Ecol. Evol*. 2017, 29, 138–148.

Dohoo, R.; Martin, W.; Stryhn, H. Veterinary Epidemiologic Research. 2nd ed. VER Inc: Charlottetown, PEI, Canada. 2009.

Domingos, E.; Nakamura, A.; Moraes, A.; Nicoleti, B.; Da Silva Camargo, V.; Bertequini, W.; Saraiva, K.; Vasconcelos, M. *Cryptosporidium* spp. in caged exotic psittacines from Brazil: Evaluation of diagnostic methods and molecular characterization. *Exp. Parasitol*. 2017, 184, 109–114.

Dunn, A.; Hatcher, M.J. Parasites and biological invasions: parallels, interactions, and control. Trends Parasitol. 2015, 31, 189–199.

Eberhard, J.R. Breeding biology of the Monk Parakeet. *Wilson Bull*. 1998, 110, 463–473.

Edelaar, P.; Roques, S.; Hobson, E.A.; Gonçalves da Silva, A.; Avery, M.L.; Russello, M.A.; Senar, J.C.; Wright, T.F.; Carrete, M.; Tella, J.L. Shared genetic diversity across the global invasive range of the Monk Parakeet suggests a common restricted geographic origin and the possibility of convergent selection. *Mol. Ecol*. 2015, 24, 2164–2176.

Estrada-Peña, A.; Ostfeld, R.H.; Peterson, A.T.; Poulin, R.; De La Fuente, J. Effects of environmental change on zoonotic disease risk: an ecological primer. Trends Parasitol. 2014, 30, 205–214.

Evans, E. Zoonotic Diseases of Common Pet Birds: Psittacine, Passerine and Columbiform Species. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2011, 14, 457–476.

Fernández, H.; Gesche, W.; Montefusco, A.; Schlatter, R. Wild birds as reservoir of thermophilic enteropathogenic Campylobacter species in southern Chile. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1996, 91, 699–700.

Fialho, C.; Oliveira, R.; Teixeira, M.; Marques, S.; Oliveira, R.; Oliveira, R.; Araujo, F. Comparison of protozoan infection between chinchillas (*Chinchilla lanigera*) from a commercial breeding facility in southern Brazil and chinchillas from a natural reserve in Chile. *Parasitol Latinoam.* 2008, 63, 85–87.

Freitas, T.; Lindmayer, V.; Timm, L.N.; Tostes, M. Psittacosis domiciliary outbreak associated with Monk Parakeets (*Myiopsitta monachus*) in Brazil: need for surveillance and control. *JMM Case Rep*. 2014, 1, 1–4.

Global Invasive Species Database (GISD). Species profile: Myiopsitta monachus. Available online: http://www.iucngisd.org/gisd/speciesname/Myiopsitta+monachus> (accessed on 20 July 2020).

González-Acuña, D.; Silva, F.; Moreno, L.; Cerda, F.; Donoso, S.; Cabello, J.; López, J. Detection of some zoonotic agents in the domestic pigeon (*Columba livia*) in the city of Chillán, Chile. *Rev Chilena Infectol*. 2007, 24, 194–198.

González-Acuña, D.; Silva, C.; Soto, M.; Mironov, S.; Moreno, L.; González-Gómez, P.L.; Badrul, H.; Kinsella, M. Parasites of the Green-backed Firecrown (Sephanoides sephaniodes) in Chile. Rev. Mex. Biodivers. 2011b, 82, 1333–1336.

González-Acuña, D.; Lohse, E.; Cicchino, A.; Mironov, S.; Figueroa R., R.A.; Ardiles, K. Parasites of the American Kestrel (*Falco sparverius*) in South-Central Chile. *J. Raptor Res*. 2011a, 45, 188–193.

González-Hein, G. Estudio serológico de Chlamydophila psittaci, Salmonella spp., virus Pox aviar, adenovirus y virus polioma en aves del orden Psittaciforme en cautiverio en Chile central. Available online: http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/130847 (accessed on 20 July 2020).

Han, M.; Xiao, S.; An, W.; Sang, C.; Li, H.; Ma, J.; Yang, M. Co-infection risk assessment of Giardia and Cryptosporidium with HIV considering synergistic effects and age sensitivity using disability-adjusted life years. *Water Res*. 2020, 175, 1–10.

Hatcher, M.J.; Dick, J.T.A.; Dunn, A.M. Disease emergence and invasions. *Funct. Ecol*. 2012, 26, 1275–1287.

Henricksen, S.; Pohlenz, J. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet. Scand*. 1981, 22, 594–596.

Hernández-Brito, D.; Blanco, G.; Tella, J.L.; Carrete, M. A protective nesting association with native species counteracts biotic resistance for the spread of an invasive parakeet from urban into rural habitats. *Front Zool*. 2020, 17, 1-13.

Hosmer, D.W.; Hosmer, T.; Le Cessie, S.; Lemeshow, S. A comparison of goodness-of-fit tests for the logistic regression model. *Stat Med*. 1997, 16, 965–980.

Hulme, P.E. Invasive species challenge the global response to emerging diseases. *Trends Parasitol.* 2014, 30, 267–270.

INE. Censo de población y vivienda de Chile año 2017; INE: Santiago, Chile, 2017. Available online: http: //resultados.censo2017.cl/ (accessed on 23 February 2021).

Iriarte, A.J.; Lobos, G.A.; Jaksic, F.M. Invasive vertebrate species in Chile and their control and monitoring by governmental agencies. *Rev. Chil. Hist. Nat*. 2005, 78, 143–154.

Keesing, F.; Belden, L.K.; Daszak, P.; Dobson, A.; Harvell, C.D.; Holt, R.D.; Hudson, P.; Jolles, A.; Jones, K.E.; Mitchell, C.E.; et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*. 2010, 468, 647–652.

King, B.J.; Hoefel, D.; Daminato, D.P.; Fanok, S.; Monis, P.T. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. *J. Appl. Microbiol*. 2008, 104, 1311–1323.

Kleinbaum, D.; Klein, M. Logistic Regression: A Self-Learning Text. 3rd ed. Springer: New York, NY. 2010.

Kuiper, S. Introduction to Multiple Regression: How Much Is Your Car Worth. *J. Stat. Educ*. 2008, 16, 3.

Kulldorf, M. A spatial scan statistic. Commun. Stat. Theory Methods. 1997, 26, 1481–1496.

Kulldorff, M.; Ims Inc. SatScan v8.0.1 Software for the spatial and space-time scan statistics. Boston, M.A. 2009.

Kulldorf, M.; Nagarwalla, N. Spatial disease clusters: Detection and inference. *Stat Med*. 1995, 14, 799–810.

Lal, A.; Baker, M.G.; Hales, S.; French, N.P. Potential effects of global environmental changes on cryptosporidiosis and giardiasis transmission. *Trends Parasitol*. 2013, 29, 83–90.

Liu, Y.; Dong, S.; Kuhlenschmidt, M.S.; Kuhlenschmidt, T.B.; Drnevichd, J.; Nguyena, T.H. Inactivation mechanisms of *cryptosporidium parvum* oocysts by solar ultraviolet irradiation. *Environ. Sci. Water Res. Technol*. 2015, 1, 188–198.

Ludwig, R.; Marques, S. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in mammals at a zoo in southern Brazil. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol*. 2011, 70, 122–128.

McDonnell, P.A.; Scott, K.G.-E.; Teoh, D.A.; Olson, M.E.; Upcroft, J.A.; Upcroft, P.; Buret, A.G. *Giardia duodenalis* trophozoites isolated from a parrot (*Cacatua galerita*) colonize the small intestinal tracts of domestic kittens and lambs. *Vet. Parasitol*. 2003, 111, 31–46.

Martin, L.F.; Bucher, E.H. Natal dispersal and first breeding age in monk parakeets. *Auk*. 1993, 110, 930–933.

Martínez-de la Puente, J.; Díez-Fernández, A.; Montalvo, T.; Bueno-Marí, R.; Pangrani, Q.; Soriguer, R.C.; Senar, J.C.; Figuerola, J. Do Invasive Mosquito and Bird Species Alter Avian Malaria Parasite Transmission? *Diversity*. 2020, 12, 111, 1–10.

Molina, N.; Polverino, D.; Minvielle, M.; Apezteguia, M.; Aguilar, M.; Basualdo, J. Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*. *Parasitol Latinoam*. 2006, 61, 133–137.

Mooney, H.A.; Cleland, E.E. The evolutionary impact of invasive species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001, 98, 5446–5451.

Morinha, F.; Carrete, M.; Tella, J.; Blanco, G. High Prevalence of Novel Beak and Feather Disease Virus in Sympatric Invasive Parakeets Introduced to Spain From Asia and South America. *Diversity*. 2020, 12, 192, 1–9.

Morrisey, J.K. Gastrointestinal Diseases of Psittacine Birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 1999, 8, 66–74.

Myczko, Ł.; Dylewski, Ł.; Sparks, T.M.; Łochynski, M.; Tryjanowski, P. Co-occurrence of birds and bats in natural nest-holes. *Ibis*. 2016, 159, 235–237.

Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; da Fonseca, G.A.B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000, 403, 853–858.

Nakamura, A.A.; Meireles, M.V. Cryptosporidium infections in birds - a review. *Rev. Bras. Parasitol*. 2015, 24, 253–267.

Nakazawa, M. fmsb: Functions for Medical Statistics Book with some Demographic Data. R package version 0.7.0. 2019.

Olson, M.E.; Goh, J.; Phillips, M.; Guselle, N.; McAllister, T.A. *Giardia* Cyst and *Cryptosporidium* Oocyst Survival in Water, Soil, and Cattle Feces. *J. Environ. Qual*. 1999, 28, 1991–1996.

Olrog, C. Las Aves Sudamericanas. Una Guía De Campo. Torno L.; Fundación Instituto M. Lillo. Universidad Nacional de Tucumán: San Miguel de Tucumán, Argentina, 1968.

Osburn, B.; Scott, C.; Gibbs, P. One World - One Medicine - One Health: emerging veterinary challenges and opportunities. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 2009, 28, 481–486.

Pastenes, A. Identificación de endoparásitos con riesgo zoonótico en excremento de perros recolectados desde las principales plazas públicas de las comunas del gran Santiago. Available online: http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/143157 (accessed on 15 July 2020).

Plutzer, J.; Tomor, B. The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and Cryptosporidium oocysts in Hungary. *Parasitol. Int*. 2009, 58, 227–231.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2016.

Ravish, M.L.; Reavill, D.R.; Hess, L.; Childress, A.L.; Wellejan Jr., J.F.X. Gastrointestinal Cryptosporidiosis in Captive Psittacine Birds in the United States: A Case Review. *J. Avian Med. Surg*. 2014, 28, 297–303.

Reyes, S.; Figueroa, I. Distribución, superficie y accesibilidad de las áreas verdes en Santiago de Chile. *EURE* 2010, 36, 89–110.

Rothman, K.J. Epidemiology: An Introduction. 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford. 2012.

Savioli, L.; Smith, H.; Thompson, A. Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol*. 2006, 22, 203–208.

Schulz, J.J.; Cayuela, L.; Echeverria, C.; Salas, J.; Rey Benayas, J.M. Monitoring land cover change of the dryland forest landscape of Central Chile (1975–2008). *Appl. Geogr*. 2010, 30, 436–447.

Senar, J.C.; Carrillo-Ortiz, J.G.; Ortega-Segalerva, A.; Dawson Pell, F.S.E.; Pascual, J.; Arroyo, L.; Mazzoni, D.; Montalvo, T.; Hatchwell, B.J. The reproductive capacity of Monk Parakeets (*Myiopsitta monachus*) is higher in their invasive range. *Bird Study*. 2019, 66, 136–140.

Silva, C.A. Urban sprawl and infrastructural lands: Revamping internal spaces in Santiago de Chile. *Geoforum.* 2015, 67, 36–40.

South, J.; Pruett-Jones, S. Patterns of Flock Size, Diet, and Vigilance of Naturalized Monk Parakeets in Hyde Park, Chicago. *Condor*. 2000, 102, 848–854.

Sol, D., Santos, D.M.; Feria, E.; Clavell, J. Habitat selection by the Monk Parakeet during colonization of new area in Spain. *Condor.* 1997, 99, 39–46.

Spreyer M.F., Bucher E.H.; Monk parakeet. In: Poole A, Gil F, editors. *The birds of North America*. Philadelphia, PA, USA: Cornell Lab of Ornithology; 1998. p. 1-23.

Strubbe, D.; Matthysen, E. Establishment success of invasive ring-necked and Monk Parakeets in Europe. *J. Biogeogr*. 2009, 36, 2264–2278.

Thompson, R.C.A. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *Int. J. Parasitol*. 2013, 43, 1079–1088.

Toro, H.; Saucedo, C.; Borie, C.; Gough, R.E.; Alcaíno, H. Health status of free-living pigeons in the city of Santiago. *Avian Pathol*. 1999, 28, 619–623.

Van Ham, C.; Genovesi, P.; Scalera, R. Invasive Alien Species: The Urban Dimension-Case Studies on Strengthening Local Action in Europe; IUCN: Brussels, Belgium, 2013; ISBN 9782831716251.

Viana, I.R.; Strubbe, D.; Zocche, J.J. Monk Parakeet invasion success: A role for nest thermoregulation and bactericidal potential of plant nest material? *Biol. Invasions*. 2016, 18, 1305–1315.

Vitousek P.M.; Mooney H.A.; Lubchenco J.; Melillo J.M. Human domination of Earth's ecosystems. *Science.* 1997; 277(5325): 494-499.

Wagner, N. Occupation of Monk Parakeet (*Myiopsitta monachus*) nest cavities by house sparrows (*Passer domesticus*) in Rio Grande do Sul, Brazil. *Boletín SAO*. 2012, 20, 72–78.

Xiao, L.; Fayer, R. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol*. 2008, 38, 1239–1255.

Zhang, W.; Zhang, X.; Wang, R.; Liu, A.; Shen, Y.; Ling, H. Genetic characterizations of *Giardia duodenalis* in Sheep and Goats in Heilongjang Province, China and Possibility of Zoonotic Transmission. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2012, 6, 1–8.

Zinsstag, J.; Schelling, E.; Waltner-Toews, D.; and M. Tanner, M. 2011. From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being. Prev. Vet. Med. 2011, 101, 148–156.

CAPÍTULO 3

EFECTO DE LA TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA SOBRE LA MORTALIDAD DE *TRIATOMA INFESTANS* SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A PIRETROIDES, EXPUESTOS A UNA CEPA NATIVA DE *BEAUVERIA BASSIANA* DE LA REGIÓN CHAQUEÑA, SALTA-ARGENTINA

Data de aceite: 01/11/2021
Data de submissão: 08/10/2021

Linda Vanesa Baldiviezo
Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales (FCN-UNSa)
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
Salta, Argentina
https://orcid.org/0000-0003-2764-8002

Nicolás Pedrini
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CCT La Plata. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
La Plata, Argentina
https://orcid.org/0000-0002-5383-8611

Lucía Beatriz Nieva
Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales, Cátedra de Zoología
Salta, Argentina
https://orcid.org/0000-0003-0552-8851

Rubén Marino Cardozo
Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales, Cátedra de Fisiología Animal
Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Salta
Salta, Argentina
https://orcid.org/0000-0002-4968-658X

RESUMEN: En el área endémica de *Triatoma infestans,* en la provincia de Salta-Argentina, se ha detectado la presencia de poblaciones resistentes a insecticidas piretroides y en consecuencia han ampliado su rango de distribución en los últimos años. Esto obliga a estudiar nuevas alternativas de control vectorial de la enfermedad de Chagas, tales como el biocontrol con hongos entomopatógenos. En este contexto, se evaluó la eficacia de una cepa nativa de *Beauveria bassiana* proveniente de la Región del Chaco Salteño. La virulencia se evaluó sobre grupos de ninfas de quinto estadio de *T. infestans* susceptibles y resistentes a insecticidas, expuestos a diferentes temperaturas de incubación: 19, 27 y 33 $\pm$ 0,5 °C con valores de humedad relativa (HR) de 35 y 90 $\pm$ 5 %. Las ninfas se inocularon con el hongo por inmersión en una suspensión de conidios con una concentración de 1 x 10^8 conidios/ml y controles con una solución de Tween 80 (0,01%). Los insectos tratados se colocaron en una cámara de prueba a temperatura y humedad relativa controlada según el tratamiento. Se registró diariamente la mortalidad por un periodo de 28 días post-infección. Se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p<0,0001$), no así, entre los distintos grupos de ninfas ($p=0,6692$). La mortalidad para los tratamientos con una HR del 90 % fue del 100 y 88 % y el tiempo letal medio (TL50) varió entre 7,5 y 11,5 días; mientras que, para una HR del 35% la mortalidad fue ≤ 50 % con TL50 entre 26,5 y 28 días, para ambos grupos (Tukey α=0,05). Estos resultados preliminares indican que la cepa regional expresa mejor su patogenicidad a

una HR del 90%, independientemente de las temperaturas ensayadas y los grupos de ninfas, lo que constituye un dato muy relevante para el uso de esta cepa como bioinsecticida de *T. infestans* en futuros ensayos de campo.
PALABRAS CLAVES: *Triatoma infestans,* cepa nativa de *Beauveria bassiana,* resistencia a piretroides, control biológico, enfermedad de Chagas.

EFFECT OF TEMPERATURE AND RELATIVE HUMIDITY ON THE MORTALITY OF *TRIATOMA INFESTANS* SUSCEPTIBLE AND RESISTANT TO PYRETHROIDS, EXPOSED TO A NATIVE STRAIN OF *BEAUVERIA BASSIANA* FROM THE CHAQUEÑA REGION, SALTA-ARGENTINA

ABSTRACT: In the endemic area of *Triatoma infestans*, in the province of Salta-Argentina, the presence of populations resistant to pyrethroid insecticides has been detected and consequently their range of distribution has expanded in recent years. This makes it necessary to study new alternatives for vector control of Chagas disease, such as biocontrol with entomopathogenic fungi. In this context, the efficacy of a native strain of *Beauveria bassiana* from the Chaco Salteño region was evaluated. Virulence was evaluated on groups of fifth-stage *T. infestans* nymphs susceptible and resistant to insecticides, exposed to different incubation temperatures: 19, 27 and 33 $\pm$ 0.5 °C with relative humidity (RH) values of 35 and 90 $\pm$ 5 %. Nymphs were inoculated with the fungus by immersion in a conidia suspension with a concentration of 1 x 10^8 conidia / ml and controls with a Tween 80 solution (0.01%). The treated insects were placed in a test chamber at controlled temperature and relative humidity according to the treatment. Mortality was recorded daily for a period of 28 days post-infection. Significant differences were found between the different treatments ($p<0.0001$), but not between the different groups of nymphs ($p= 0.6692$). Mortality for treatments with a HR of 90% was 100 and 88% and the mean lethal time (TL50) ranged between 7.5 and 11.5 days; whereas, for an HR of 35%, mortality was ≤ 50% with TL50 between 26.5 and 28 days, for both groups (Tukey α = 0.05). These preliminary results indicate that the native strain better expresses its pathogenicity at a RH of 90%, regardless of the temperatures tested and the nymph groups, which constitutes a very important data for the use of this strain as a *T. infestans* bioinsecticide in future field trials.
KEYWORDS: *Triatoma infestans,* native strain of *Beauveria bassiana,* pyrethroid resistance, biological control, Chagas disease.

1 I INTRODUCCIÓN

Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) es el principal vector de la enfermedad de Chagas en el Sur de América Latina y ha sido objeto de continuos programas de control para reducir el riesgo de transmisión de la enfermedad. Una de las estrategia de control empleada ha sido la aplicación, dentro de la vivienda, de insecticidas piretroides (SCHOFIELD & DÍAS, 1999). Sin embargo, se ha reconocido que esta estrategia tiene una eficacia limitada, principalmente en la Región Chaqueña que comparten Argentina, Bolivia y Paraguay (GUREVITZ *et al*., 2013). Además, en los últimos años se ha documentado la aparición de poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides en amplias regiones

de Bolivia y Argentina (CARDOZO *et al*., 2010; GERMANO *et al*., 2010; LARDEUX *et al*., 2010). Estos aspectos han obligado a estudiar nuevas alternativas de control vectorial de la enfermedad de Chagas. Existe abundante información sobre la interacción *T. infestans - B. bassiana* que han mostrado resultados prometedores (LUZ *et al*., 1998; JUÁREZ *et al*., 2000; LECUONA *et al*., 2001; PEDRINI *et al*., 2009; FORLANI *et al*., 2011; 2015; LOBO *et al*., 2015; 2018; BALDIVIEZO *et al*., 2020), incluso desde una perspectiva coevolutiva (MANNINO *et al*., 2018).

El proceso de patogénesis depende de muchos factores que se relacionan con la interacción hongo-hospedador, como la capacidad de germinación, la tasa de crecimiento, rendimiento y la producción de esporas, entre otros factores (VARELA & MORALES, 1996; SAFAVI *et al*., 2007; PEDRINI *et al*., 2018). Estas propiedades permiten seleccionar cepas con características óptimas para lograr resultados de control efectivos; sin embargo, el hongo también necesita ser específico del huésped, virulento y adaptado a un entorno regional (DE LA ROSA *et al*., 2002). En este sentido, la exploración de aislamientos locales es crucial para establecer programas de control biológico a largo plazo, efectivos y sostenibles.

En el presente trabajo, estudiamos el comportamiento de la virulencia de una cepa nativa de *B. bassiana* caracterizada por BALDIVIEZO *et al*. (2020), sobre ninfas de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides en diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa; con el fin de evaluar su incorporación a los programas actuales de manejo de triatominos resistentes a piretroides en la provincia de Salta, Argentina.

2 | METODOLOGÍA

2.1 Aislamiento y cultivo de *Beauveria bassiana*

Se trabajó con la cepa nativa de *B. bassiana* denominada Bb-C001 (BALDIVIEZO *et al*., 2020); aislada del cadáver de un *T. infestans* capturado en agosto de 2011 en la “Misión Aborigen el Cañaveral”, municipio de Santa Victoria Este, departamento Rivadavia, provincia de Salta, Argentina (22°16’52.78”S; 62°42’5.60”W) (Fig. 1).
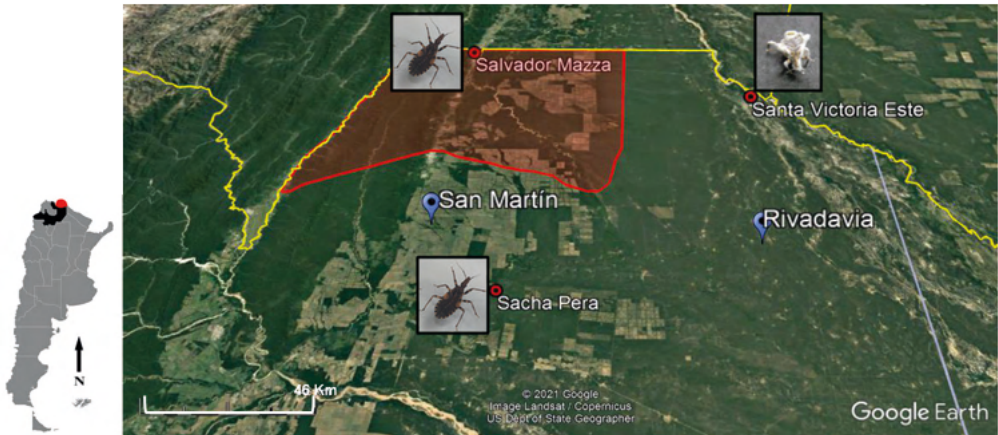
Figura 1. Muestra el lugar de procedencia de los *T. infestans* resistentes a piretroides en la localidad de Salvador Mazza y susceptibles a piretroides en la comunidad aborigen Sacha Pera, ambos lugares pertenecientes al departamento San Martín y el lugar donde se encontró la cepa nativa de *B. bassiana,* Santa Victoria Este, departamento Rivadavia, Salta-Argentina. El área en rojo, es zona de resistencia a piretroides detectada hasta el momento (PICOLLO *et al.*, 2005; CARDOZO *et al.*, 2010; GERMANO *et al*).

La cepa se aisló del cadáver de un insecto infectado y se cultivó en Agar Papa Dextrosa (APD), a partir de esta fuente de inóculo; por aislamiento monospórico, se obtuvieron cultivos puros (Fig. 2).

La cepa se mantiene actualmente, en el cepario del Laboratorio de Investigación en Biocontroladores (LIBIOC-MSPS) a cargo del Ministerio de Salud Pública de Salta-Argentina, como cultivo esporulado en Glicerol (10 %) a - 20 °C; con el objetivo de preservarla en su estado original. Los ensayos de laboratorio, se llevaron a cabo en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta- Argentina (FCN-UNSa).
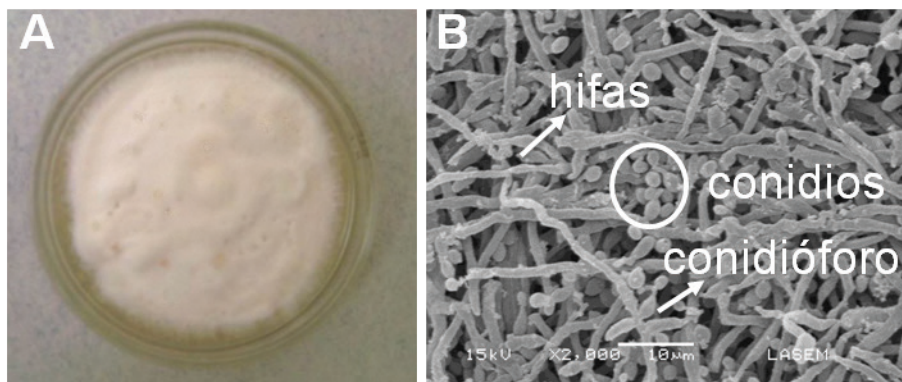
Figura 2. (A) Cultivo puro de la cepa Bb-C001 de *B. bassiana* en APD. (B) Vista al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), marca JEOL Modelo JSM 6480 del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido (LASEM), INIQUI-CONICET, UNSa, donde se observan las estructuras del hongo.

2.2 Preparación de la suspensión de conidios, concentración y evaluación de la viabilidad

La suspensión de conidios para la realización de los bioensayos fue obtenida de la siguiente manera. A partir del cultivo puro del hongo, se sembraron placas con medio Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) suplementado con cutícula de vinchucas para incrementar su patogenicidad (GARCÍA *et al*., 2001). Para la preparación del medio de cultivo se recolectaron vinchucas muertas del insectario del Bioterio de la FCN-UNSa, se las colocó en hipoclorito de sodio al 0,5% por 10 min., se lavó con agua destilada, luego se maceró en una solución amortiguadora fosfato pH 7,0, se adicionó 0,5 g del macerado a 100 ml del medio de cultivo SDA y se esterilizó la mezcla en autoclave a 120°C a 1 atm. de presión durante 20 min. Las placas se incubaron en estufa a 27 ± 2 °C de 10-15 días hasta observar esporulación. Los conidios se cosecharon raspando la superficie de la placa de Petri con una espátula en una cabina de bioseguridad en condiciones asépticas y se colocaron en un tubo Falcon con 15 ml de una solución estéril de Tween 80 (0,01%).

La concentración de conidios de la suspensión obtenida fue determinada por conteo directo usando un hemocitómetro o cámara de Neubauer. La misma fue ajustada a una concentración de 1 x 10^8 conidios/ml con Tween 80 (0,01 %) para realizar los bioensayos.

Para evaluar la viabilidad (porcentaje de germinación) se tomaron de la suspensión de conidios 5 alícuotas de 5*µ* cada una y se incubaron en placas con SDA a 27 ± 2 °C durante 24 horas. Se agregó azul de lactofenol y se observó al microscopio utilizando un objetivo de inmersión (100x). Se calculó el porcentaje de germinación como: N° de conidios germinados / N° total de conidios x 100. Se consideró conidio germinado, a aquel cuyo tubo germinal tenía el doble del diámetro del conidio.

2.3 Cría de *Triatoma infestans*

Se trabajó con una progenie de ninfas de quinto estadio (V) de *T. infestans* susceptibles (S) provenientes de insectos capturados en "Misión Sachapera", municipio de Tartagal, departamento San Martín (22°30'0"S; 63°50'0"W) y resistentes a piretroides (R); capturados en la localidad de Salvador Mazza, departamento San Martín (22°3'0"S; 63°42'0"W), provincia de Salta, Argentina (Fig. 1). Las colonias de insectos fueron mantenidas y criadas en condiciones controladas de temperatura (28 ± 1 °C), humedad relativa (50 -60 %) y fotoperiodo 12:12 horas (luz: oscuridad) en el insectario del Bioterio de la FCN-UNSa. Para la cría se emplearon cubas de plástico con un fondo y una tapa de malla plástica, en el fondo un soporte con una bandeja del mismo material para la recolección de los huevos en el caso de los adultos.

Los insectos fueron alimentados con sangre de ratones anestesiados con Ketamina. Todos los protocolos de cuidado animal y experimental de laboratorio se realizaron siguiendo el Reglamento del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y Estudios de Campo (CICUALEC) FCN-UNSa.

2.4 Bioensayos de infección

Para los bioensayos, las ninfas S y R de *T. infestans* fueron separadas de la cría y colocadas en frascos de plásticos, se encontraban en perfecto estado nutricional y con una semana de ayuno antes de iniciar los bioensayos. Los bioensayos consistieron en la inoculación del hongo por el método de inmersión, las ninfas fueron sumergidas de a una por vez, durante 10 segundos, dentro de una suspensión de conidios de *B. bassiana* (Bb-C001) con Tween 80 (0,01 %) a una concentración de 1 x 10^8 conidios/ml y una viabilidad del 90 %. Para los controles se utilizó una solución de Tween 80 (0,01 %). Una vez inoculados, los insectos fueron colocados en envases plásticos, en grupos de 10, tapados con una gasa de malla fina e incubados en una cámara de prueba a una temperatura (T°) y humedad relativa (HR) controlada según el ensayo.

2.5 Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la mortalidad de los *T. infestans* expuestos a la cepa nativa de *B. bassiana*

Para evaluar el efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre la mortalidad de las ninfas de *T. infestans* tratadas con el hongo, el método utilizado fue modificado de LECUONA *et al.* (2001). Se utilizó una estufa con control de temperatura como cámara de prueba. Las temperaturas de incubación ensayadas fueron de 19, 27 y 33 ± 0,5 °C para valores de HR de 35 y 90 ± 5 %. Para obtener estos valores de HR, se utilizó silica gel para reducir y mantener la humedad dentro de la cámara al 35 % y gasas humedecidas con agua estéril para una HR del 90 %, con recambio continuo. Tanto la humedad como la temperatura, fueron monitoreadas con un Datalogger programable de Maxithermal (precisión: ± 0,5 °C y ±5%) que se colocó dentro de la cámara de prueba.

Se realizaron tres réplicas de 10 ninfas por grupo (S y R) y tratamiento (seis

combinaciones de T° y HR). Se registró la mortalidad diaria durante 28 días después de la infección fúngica. Los insectos muertos, se separaron diariamente y se colocaron en cámara húmeda a 27 °C para confirmar la muerte por micosis (Fig. 5).
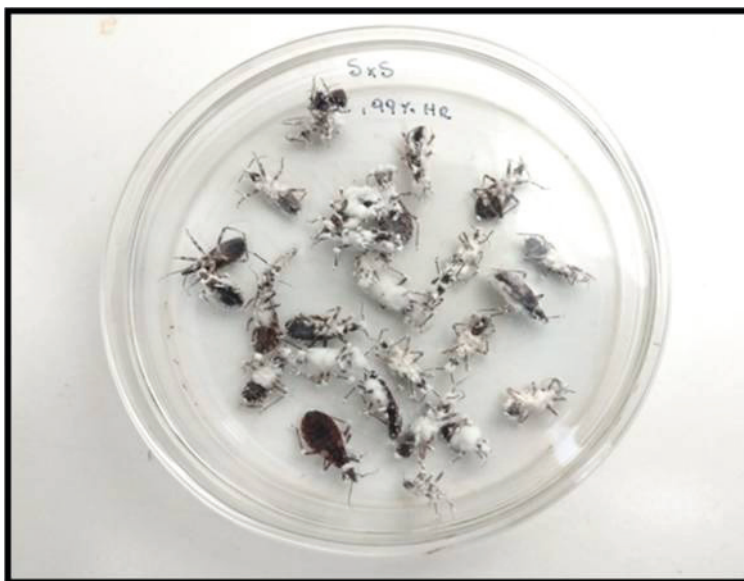
Figura 5. Ninfas de *T. infestans* con signos de micosis.

2.6 Análisis estadístico

Los porcentajes de mortalidad calculados en cada tratamiento, fueron analizados estadísticamente utilizando ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples Tukey (α= 0.05). Se calculó el Tiempo Letal Medio (TL50), que informa el tiempo (días) en el que muere el 50 % de los insectos infectados en las distintas condiciones ensayadas y se construyeron curvas de supervivencia por el método de Kaplan-Meier. Se utilizó el software GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) para el análisis estadístico.

3 I RESULTADO Y DISCUSIÓN

Al comparar el efecto de las distintas T° y HR ensayadas sobre la mortalidad de las ninfas de *T. infestans*, el ANOVA mostró diferencias significativas entre ellas ($F=24,59$; $p<0,0001$), no así, entre los distintos grupos (R y S) ($F=0,19$; $p=0,6692$).

Los porcentajes de mortalidad calculados para cada combinación de temperatura y HR en los distintos grupos de ninfas, se muestran en la Tabla 1.

T (°C)	HR (%)	Susceptibles		Resistentes		*Mtemp* *
		Mort (%)	**TL50 (días)**	**Mort (%)**	**TL50 (días)**	
19	**35**	40	In	50 (5,7)	26,5	**45 (3,4) A**
	90	100	9	100	10	**100 B**
27	**35**	87 (8,8)	11,5	77 (3,3)	11	**82 (4,7) B**
	90	100	8	100	9	**100 B**
33	**35**	50 (6,6)	28	50 (5,9)	28	**50 (8,6) A**
	90	83 (8,8)	8	93 (3,3)	7,5	**88 (4,7) B**
Mgrupo **		**76,7 (6,2) a**		**78,3 (5,7)a**		

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad y TL50 de las ninfas de *T. infestans* tratadas con la cepa Bb-C001 de *B. bassiana* y mantenidas a diferentes temperaturas y niveles de humedad relativa.

T= Temperatura, HR= Humedad relativa, Mort= Porcentaje de mortalidad (± SE) de ninfas susceptibles y resistentes 28 días después de la infección, TL50= Tiempo Letal para el 50 % de mortalidad, In= No alcanzo el 50 % de mortalidad. * Mortalidad media (% ± SE) de los dos grupos para cada temperatura y humedad relativa ensayada. ** Mortalidad media (%± SE) de cada grupo de ninfas en todas las temperaturas y humedades relativas ensayadas. Medias seguidas de letras mayúsculas o minúsculas distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey (α=0.05).

Los valores más altos de mortalidad, entre 100 % y 88 %, se registraron para los tratamientos con una HR del 90 %, para todas las temperaturas en ambos grupos de ninfas y fueron estadísticamente diferentes de los tratamientos con una HR 35 %; que exhibieron una mortalidad ≤ 50 %, excepto el de temperatura de 27 °C que registró un valor del 82 % (Tukey α=0,05).

La figura 6 muestra las curvas de supervivencia para cada grupo y temperatura en ambas condiciones de HR. Las ninfas S y R expuestas a una HR del 35 %, alcanzaron una supervivencia máxima del 50 % a 19 y 33 °C; excepto a 27 °C que fue mayor. El TL50 varió entre 26,5 y 28 días. Para una HR 90 %, la supervivencia se registró por debajo del 20 % para todos los casos ensayados y los valores de TL50 oscilaron entre 7,5 y 11,5 días (Tabla 1; Fig. 6).
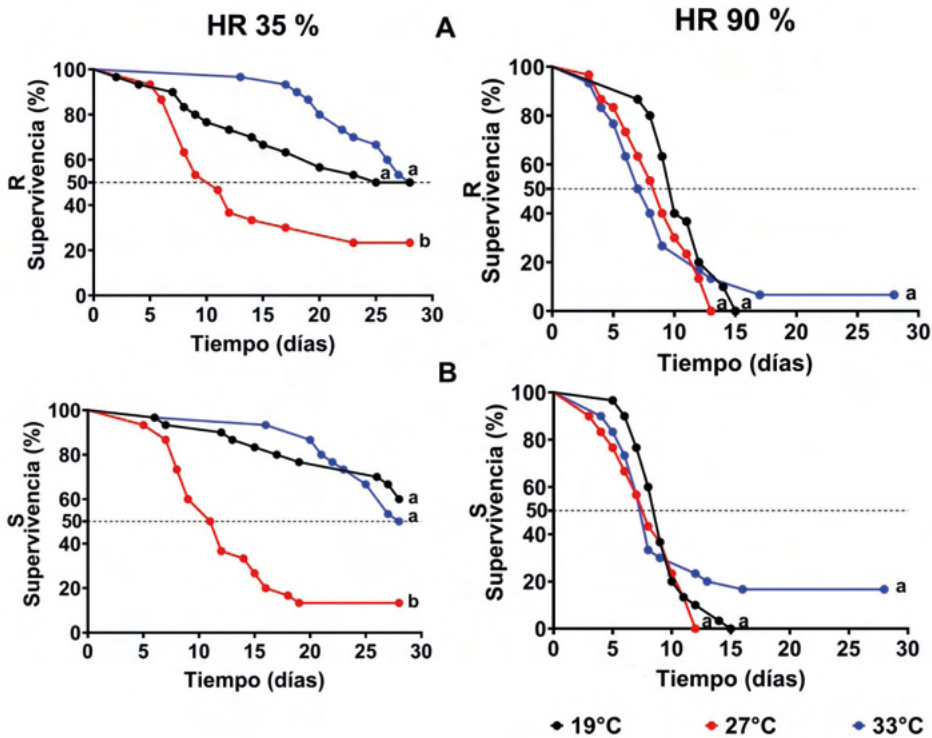
Figura 6. Curvas de supervivencia de las ninfas de *T. infestans* inoculadas con el hongo y expuestas a distintas temperaturas y humedades relativas (HR). (A) Ninfas resistentes a piretroides (R). (B) ninfas susceptibles (S). No se observaron insectos muertos en los controles. Letras distintas indican diferencias significativas en las curvas de supervivencia según la prueba de Kaplan y Meier (α = 0,05).

Tanto para las ninfas S como R la función de supervivencia disminuyó más rápidamente a una HR del 90%, independientemente de las temperaturas evaluadas, lo que indica; que la cepa nativa de *B. bassiana* (Bb-C001) es más dependiente de la HR que de la temperatura. Estos resultados difieren de los encontrados por LECUONA *et al.* (2001), quienes mostraron que la infección de *B. bassiana* sobre *T. infestans* ocurrió independientemente de la humedad relativa.

LUZ y FARGUES (1998), señalaron que la humedad relativa es más importante para la esporulación del hongo en cadáveres de insectos que para la penetración e infección del hongo. Nuestros resultados contradicen esta afirmación, ya que en la interacción *T. infestans – B. bassiana*, la humedad relativa es el factor más importante involucrado en la expresión de patogenicidad independientemente de las temperaturas evaluadas.

Teniendo en cuenta que *T. infestans* es muy activo en la Región del Chaco Argentino durante la temporada más cálida (entre 25 y 32 °C) y húmeda (entre 62 % y 82%) (GORLA; SCHOFIELD, 1985), el comportamiento observado de la cepa Bb-C001 de *B. bassiana* bajo un rango de temperatura y humedad relativa similar, apoya la prueba de esta cepa como

bioinsectida en el área endémica.

4 I CONCLUSIÓN

Estos resultados preliminares indican que la cepa Bb-C001 de *B. bassiana,* expresa mejor su patogenicidad a una HR alta (90%), independientemente de las temperaturas evaluadas en ambos grupos de ninfas (S y R), lo que constituye un dato muy importante para el uso de esta cepa como un bioinsecticida de *T. infestans* en futuros ensayos de campo.

REFERENCIAS

BALDIVIEZO, L. V., PEDRINI, N., SANTANA, M. *et al*. Isolation of *Beauveria bassiana* from the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* in the Gran Chaco Region of Argentina: Assessment of Gene Expression during Host-Pathogen Interaction. **Journal of Fungi**, 6, n. 4, p. 219, 2020.

CARDOZO, R. M., PANZERA, F., GENTILE, A. G., SEGURA, M. A. *et al*. Inheritance of resistance to pyrethroids in *Triatoma infestans*, the main Chagas disease vector in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, 10, n. 8, p.1174-1178, 2010.

DE LA ROSA, W., LOPEZ, F. L., LIEDO, P. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, 95, n. 1, p.36-43, 2002.

FORLANI, L., PEDRINI, N., JUÁREZ, M. P. Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans.* **Research and Reports in Tropical Medicine**, 2, p.135–140, 2011.

FORLANI, L., PEDRINI, N., GIROTTI, J. R. *et al.* Biological control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* combined with an aggregation cue: field, laboratory and mathematical modeling assessment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 9, n. 5, p. e0003778, 2015.

GARCÍA, M. T. G., JIMÉNEZ, A. V., PARDEY, A. E. B. Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. **Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)**, 60, p. 31-35, 2001.

GERMANO, M. D., ACEVEDO, G. R., CUETO, G. M. *et al*. New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. **Journal of Medical Entomology**, 47, n. 6, p.1077-1081, 2010.

GORLA, D. E., SCHOFIELD, C. J. 1985. Analysis of egg mortality in experimental populations of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. **Bull. Soc. Vector Ecol**, 10, p. 107-117, 1985.

GUREVITZ, J. M., GASPE, M. S., ENRIQUEZ, G. F. *et al*. Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. **PLoS Neglected and Tropical Diseases**, 7, n. 4, p. e2158, 2013.

JUÁREZ, M. P., CRESPO, R., CALDERÓN-FERNÁNDEZ, G. *et al*. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas disease vector. **Journal of Invertebrate Pathology**, 76, p.198–207, 2000.

LARDEUX, F., DEPICKERE, S., DUCHON, S., CHAVEZ, T. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. **Tropical Medicine and International Health**, 15, n. 9, p.1037-1048, 2010.

LECUONA, R. E., EDELSTEIN, J. D., BERRETTA, M. F. *et al*. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, 38, n. 2, p.172–179, 2001.

LOBO, L. S., LUZ, C., FERNANDES, É. K. K. *et al*. Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 128, p.14–21, 2015.

LOBO, L. S., GIROTTI, J. R., MIJAILOVSKY, S. J. *et al*. Synthesis and secretion of volatile short-chain fatty acids in *Triatoma infestans* infected with *Beauveria bassiana*. **Medical and Veterinary Entomology**, 32, n. 3, p. 358-364, 2018.

LUZ, C., SILVA, I. G., CORDEIRO, C. M. *et al. Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) as a possible agent for biological control of Chagas disease vectors. **J. Med. Entomol**, 35, p. 977-979, 1998.

LUZ, C., FARGUES, J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebr. Pathol**, 72, p. 97-103, 1998.

MANNINO, M. C., JUÁREZ, M. P., PEDRINI, N. Tracing the coevolution between *Triatoma infestans* and its fungal pathogen *Beauveria bassiana*. **Infection, Genetics and Evolution**, *66*, p.319-324, 2018.

PEDRINI, N., MIJAILOVSKY, S. J., GIROTTI, J. R. *et al*. Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. **PLoS Neglected and Tropical Diseases**, 3, n. 5, p. e434, 2009.

PEDRINI, N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. **Fungal Biology**, 122, p. 538-545, 2018.

PICOLLO, M. I., VASSENA, C., ORIHUELA, P. S. *et al*. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. **Journal of Medical Entomology**, 42, n. 4, p. 637-642, 2005.

SAFAVI, S. A., SHAH, F. A., PAKDEL, A. K. *et al.* Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, 270, n. 1, p.116-123, 2007.

SCHOFIELD, C.J., DÍAS, J.C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. ***Advances in Parasitology***, 42, p.1-27, 1999.

VARELA, A., MORALES, E. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei.* ***Journal of Invertebrate Pathology***, 67, n. 2, p.147-152, 1996.

CAPÍTULO 4

PREVALÊNCIA DE CANDIDÍASE ORAL EM PACIENTES HIV POSITIVOS NO MUNICÍPIO DE NOVA IGUAÇU, RIO DE JANEIRO, BRASIL

Data de aceite: 01/11/2021
Data de submissão: 08/10/2021

Fernando Antonio Machado Miguel
Centro de Ensino Superior de Valença - CESV
Valença, RJ
ID Lattes: 4459005853078251

Paulo Cesar Ribeiro
Universidade Iguaçu - UNIG
Nova Iguaçu – RJ
ID Lattes: 4953842424495281

Paula Avelar da Silva Ribeiro Goulart
Universidade Iguaçu - UNIG
Nova Iguaçu, RJ
ID Lattes: 3747564257868424

Marcus Heleno Borges Ribeiro
Universidade Iguaçu - UNIG
Nova Iguaçu, RJ
ID Lattes: 3209178808297899

Claudia Maria Blanco Moreira Norberg
CLA Reabilitação Oral – CLARO Odontologia
Rio de Janeiro, RJ
ID Lattes: 7268447041585003

Paulo Roberto Blanco Moreira Norberg
Faculdade Metropolitana São Carlos - FAMESC
Bom Jesus do Itabapoana, RJ
ID Orcid: 0000-0002-4492-4614

Antonio Neres Norberg
Membro Titular da Academia Brasileira de Medicina Militar
Rio de Janeiro, RJ
Faculdade Metropolitana São Carlos – FAMESC
Bom Jesus do Itabapoana, RJ
ID Orcid: 0000-0002-6895-4586

RESUMO: A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é uma pandemia caracterizada por uma alteração do sistema imunológico, cuja principal característica é uma diminuição de linfócitos CD4. Esta circunstância facilita o aparecimento de infecções oportunistas e o desenvolvimento de processos neoplásicos que poderão levar o paciente a um estado conhecido como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e à morte. **Objetivo:** Identificar as espécies do gênero *Candida* de pacientes portadores da SIDA e acometidos de lesões na cavidade bucal e internados na enfermaria de infectologia do Hospital Geral de Nova Iguaçu. **Material e métodos:** foram coletadas 39 amostras das lesões bucais e examinadas no laboratório de micologia do Instituto de Biologia do Exército (IBEx) através de técnicas microbiológicas. **Resultados:** todas as culturas das 39 amostras foram positivas para espécies do gênero *Candida*. *C. albicans* foi a mais frequente (74%), *C. tropicalis* (15%), *C. glabrata* (8%) e *C. lambica* (3%). A forma clínica mais frequente foi a pseudomembranosa, com 24 casos (61,54%), seguida da eritematosa (25,64%) e a forma multifocal crônica (12,82%). Um dos pacientes

apresentou a forma clínica membranosa com associação de *C. albicans* e *Hystoplasma capsulatum*. **Conclusões:** a candidose bucal constitui um dos graves problemas de saúde entre as pessoas imunocomprometidas. O diagnóstico precoce da doença e o tratamento adequado são fundamentais para diminuírem infecções oportunistas.
PALAVRAS-CHAVE: Candidíase oral, *Candida* spp, HIV, Infecções oportunistas.

ORAL CANDIDIASIS PREVALENCE IN HIV PATIENTS IN THE CITY OF NOVA IGUAÇU, RIO DE JANEIRO, BRAZIL

ABSTRACT: Infection by the human immunodeficiency virus (HIV) is a pandemic characterized by an alteration in the immune system, whose main characteristic is a decrease in CD4 lymphocytes. This circumstance eases the appearance of opportunistic infections and the development of neoplastic processes that may lead the patient to a clinical state known as Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and death. **Objective:** To identify the species of the genus *Candida* from patients with AIDS and affected by lesions in the oral cavity and admitted to the infectious diseases ward of the Nova Iguaçu General Hospital. **Material and methods:** 39 samples of oral lesions were collected and examined in the mycology laboratory of the Army Biology Institute (IBEx) through microbiological techniques. **Results:** all cultures of the 39 samples were positive for species of the genus *Candida*. *C. albicans* was the most frequent (74%), followed by *C. tropicalis* (15%), *C. glabrata* (8%) and *C. lambica* (3%). The most frequent clinical form was pseudomembranous, with 24 cases (61.54%), followed by erythematous (25.64%) and chronic multifocal form (12.82%). One of the patients presented the membranous clinical form with association of *C. albicans* and *Hystoplasma capsulatum*. **Conclusions:** Oral candidiasis constitutes one of the serious health problems among immunocompromised people. Early diagnosis of the disease and adequate treatment are fundamental to reduce opportunistic infections.
KEYWORDS: Oral candidiasis, *Candida* spp, HIV, opportunistic infections.

1 I INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é uma doença que foi diagnosticada pela primeira vez em 1981 nos Estados Unidos da América. Esta doença obteve de imediato caráter epidêmico explosivo, que logo se estendeu para outras regiões do mundo, passando a constituir um dos grandes problemas de saúde pública mundial (LÓPEZ & MARIN, 2001). Apesar de identificada primordialmente na América, acredita-se que a sua origem está no continente africano. A SIDA não é considerada uma doença isolada, mas a etapa final da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) faz parte de um conjunto de síndromes de doenças potencialmente fatais (AGUIRRE, 2002; VERONESI & FOCACCIA, 2015).

Em alguns indivíduos, o período que transcorre entre a infecção pelo HIV e o desenvolvimento dos sintomas sugestivos da síndrome pode ser de poucos anos, porém em outros indivíduos este período pode ser de dez anos ou mais. A maioria dos

indivíduos infectados pelo HIV sofrem períodos intermitentes da doença, cuja severidade aumenta à medida que o vírus interfere na depressão do sistema imune. Existem diversos microrganismos causadores de doenças que indicam a capacidade imunitária em distintas etapas da doença. Os médicos que acompanham os pacientes podem calcular aproximadamente em que estado se encontra o sistema imune pelos sinais que apresentam os pacientes infectados pelo HIV. A contagem do número de células CD4 por mm^3 de sangue também pode fornecer dados sobre a condição imunológica dos pacientes (LÓPEZ & MARIN, 2001; COURA, 2013; SANTA ANNA et al., 2006).

Os seres humanos vivem em harmonia relativa com um grande número de vírus, bactérias e fungos que não causam doenças nas pessoas sadias, nas quais as defesas imunológicas estão intactas, porém estes microrganismos podem aproveitar-se de um sistema debilitado como o de uma pessoa infectada pelo HIV e ocasionam as chamadas infecções oportunistas, entre as quais se encontram as candidíases, que são infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida*. Esses fungos habitualmente constituem parte da flora da cavidade oral do indivíduo sadio, e se transformam em patógenos quando existem fatores favorecedores de seu crescimento como: diabetes, gestação, carcinomas e deficiências imunitárias, entre outros, e podem causar uma infecção superficial ou profunda (LÓPEZ & MARIN, 2001; FUENTES, 1992; LÓPEZ, 1997, SHARMA et al., 2015).

O termo candidíase compreende um grupo de alterações causadas por espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. Estas alterações adquirem maior importância clínica após o uso de antibióticos de amplo espectro bacteriano, fármacos imunossupressores e, mais recentemente, com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – SIDA (LIMA et al., 2017; MATSUKA, 1986). A candidíase bucal está relacionada à infecção confinada a tecidos da cavidade bucal e peribucal (candidíase primária) e em infecção bucal resultante de doença mucocutânea crônica (candidíase bucal secundária). A candidíase primária pode ser subdividida em: pseudomembranosa aguda atrófica, multifocal crônica, hiperplásica, quelite angular e crônica atrófica ou estomatite causada por próteses dentais. As cinco primeiras variantes geralmente estão presentes em pacientes com SIDA. A forma clínica mais frequente foi representada por candidíase orofaringeana, que representa 32,6% de todas as formas clínicas diagnosticadas em pacientes na década de 1980 (MATSUKA, 1986; PINDBORG, 1989).

A patogenicidade ou virulência de um microrganismo é definida pela sua capacidade de causar doença, mediada por diversos fatores. Dentre eles, podemos citar como fatores de virulência: aderência, produção de tubo germinativo, dimorfismo, variação fenotípica, variação genotípica, formação de biofilme, produção de toxinas, produção de exoenzimas (proteinase e fosfolipase) (ÁLVARES et al., 2007; HARTMAN et al., 2016). A elevada produção de proteinase por espécies do gênero *Candida* determina uma atividade fortemente proteolítica, que facilita uma maior aderência às células do epitélio bucal e a destruição tecidual. As proteinases geralmente estão envolvidas em vários processos, que

incluem a formação de pseudomicélio, aderência e fenômeno “switching”, que contribuem ainda mais para a patogenicidade das leveduras. As fosfolipases são enzimas hidrolíticas que degradam os fosfolipídios, sendo este o maior constituinte da membrana biológica de animais, vegetais e bactérias. A presença dessa enzima na superfície da levedura propicia a lesão tecidual por danificação dos constituintes lipídicos da membrana celular do hospedeiro. Por este motivo, as cepas de leveduras que possuem altas quantidades de fosfolipases apresentam uma maior capacidade de aderência e invasão (COSTA, 2009; HARTMAN, 2016).

A candidíase oral foi descrita como doença associada aos primeiros casos descritos na literatura sobre SIDA, constituindo a infecção fúngica mais frequente em pacientes HIV positivos. Considera-se que até 90% dos indivíduos infectados pelo HIV sofrerão pelo menos um episódio de candidíase orofaringeana (BORBEDO & SGARBI, 2010).

Tendo em vista os aspectos citados, o presente trabalho teve como objetivo estudar a prevalência e a etiologia das lesões bucais causadas por microrganismos do gênero *Candida* em pacientes HIV positivos internados na enfermaria de infectologia do Hospital Geral de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil.

2 I MATERIAL E MÉTODOS

O desenho da pesquisa foi observacional, analítico, do tipo transversal. A amostra foi composta de 39 pessoas com diagnóstico positivo para HIV portadores de lesões na cavidade bucal internados no ambulatório de infectologia do Hospital Geral do Município de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. O protocolo do estudo cumpriu com as normas do Comitê de Ética e Estudos Clínicos do hospital. Os pacientes foram informados sobre a finalidade do estudo e deram seu consentimento para a realização da pesquisa. Para as análises micológicas, foram coletadas amostras das lesões da cavidade bucal com o auxílio de suabes estéreis, os quais foram preservados em meio de transporte Stuart e enviados ao Laboratório de Micologia do Instituto de Biologia do Exército (IBEx), onde foram realizadas as análises. O material foi semeado em placas de Petri contendo os meios de Sabouraud-dextrose-agar e Mycosel, incubados a 37ºC por 48 horas. Amostras das colônias foram submetidas à coloração de Gram. As que apresentavam células leveduriformes foram consideradas positivas. Foi realizada a prova para a formação do tubo germinativo a fim de caracterizar as espécies. Foram colocadas amostras das colônias em tubos estéreis contendo 0,5 mL de soro humano e incubadas a 37ºC por três horas. Em seguida foi depositada uma gota de cada suspensão em lâminas que foram cobertas com lamínulas e observadas ao microscópio óptico com objetiva de 40X. A presença de filamentos que brotam das leveduras permitiu a identificação presuntiva de *Candida albicans*, e as amostras de leveduras sem tubos germinativos foram identificadas como não-*albicans*. Para a identificação final, todas as amostras foram submetidas à identificação

por provas bioquímicas pelo sistema Biomerrieux-Vitek.

3 I RESULTADOS

Os 39 pacientes examinados tinham idades entre 21 e 66 anos, sendo 20 pacientes do gênero masculino, predominando os que pertenciam à faixa etária de 30 a 39 anos (55,56%).
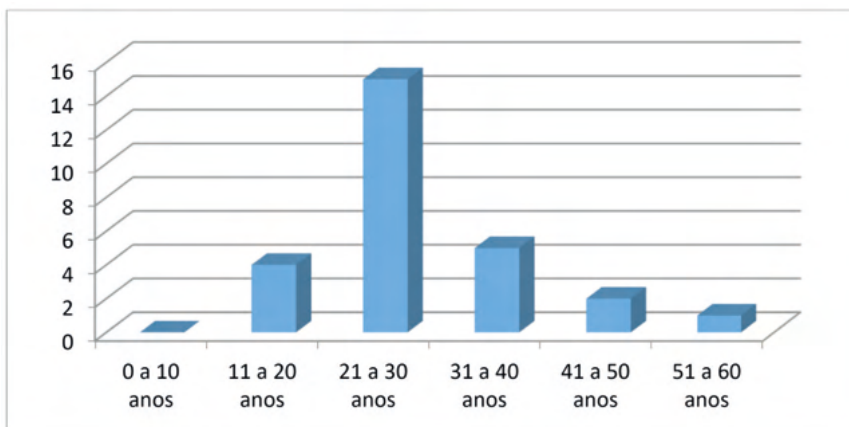
Gráfico 1 – Distribuição etária dos 27 casos de pacientes do gênero masculino portadores de SIDA por faixa etária.

Em relação ao gênero feminino, ocorreram 12 casos de SIDA, predominando a faixa etária entre 40 a 49 anos (41,67%) (Gráfico 2).
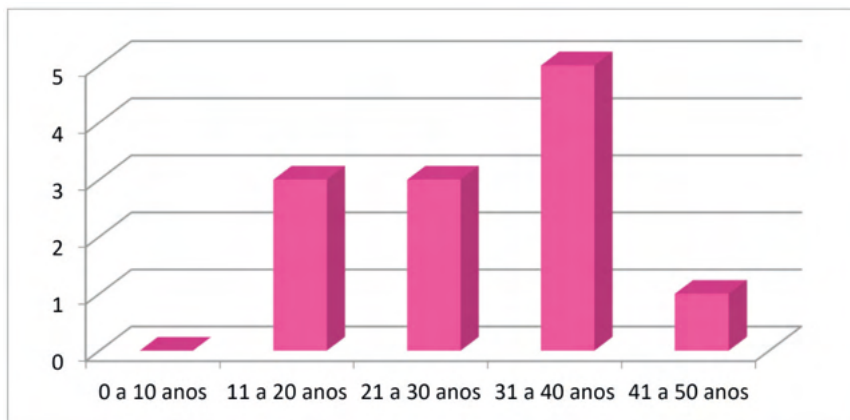
Gráfico 2 – Distribuição etária dos 12 casos de pacientes do gênero feminino portadores de SIDA por faixa etária.

Em relação ao gênero, dos 39 casos de pacientes com SIDA, 27 eram do gênero masculino, sendo 19 heterossexuais, 3 homossexuais e 5 bissexuais (gráfico 3). As 12 pacientes do gênero feminino eram heterossexuais.
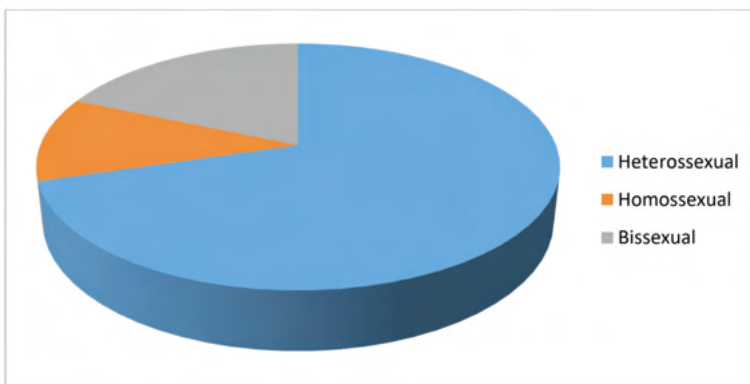
Gráfico 3 – Distribuição de 27 casos de SIDA do gênero masculino por sexualidade.
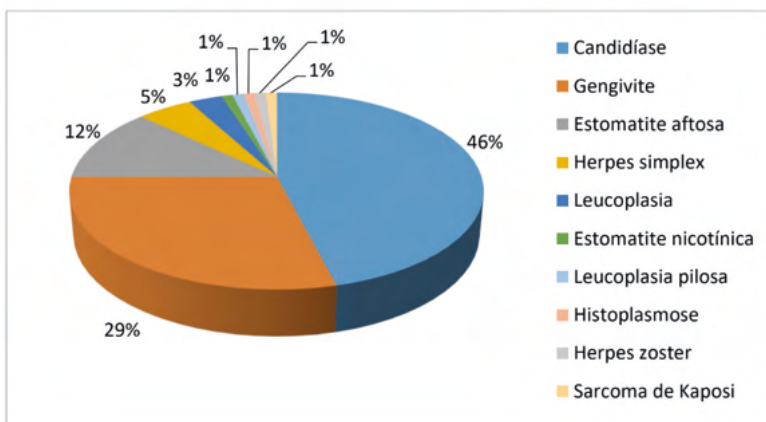
Gráfico 4 – Patologias bucais em 39 casos de SIDA.
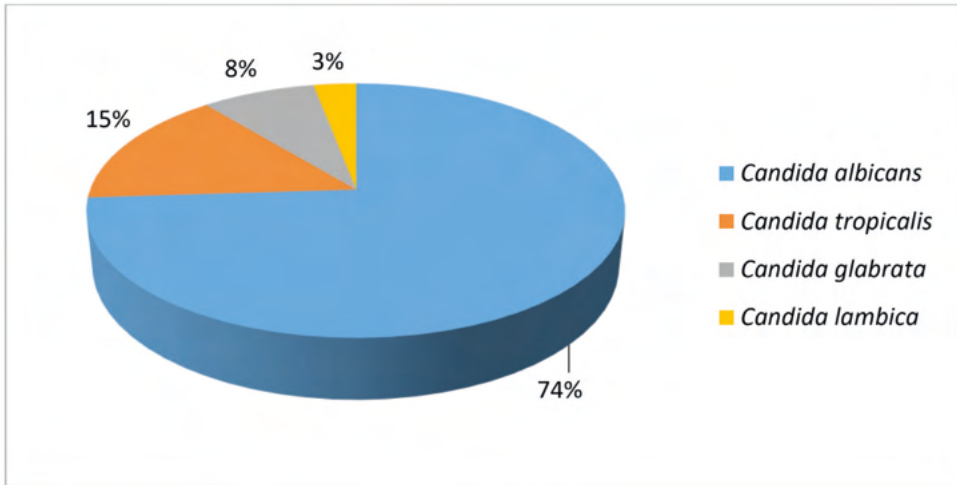
Gráfico 5 – Espécies do gênero *Candida* em 39 casos de SIDA.

Em relação ao tabagismo e uso de drogas ilícitas pelos pacientes do gênero masculino, 7 pacientes eram fumantes e usuários de drogas; 2 eram usuários de drogas, porém não fumantes; 11 eram fumantes porém não usuários de drogas; 7 eram não fumantes e não-usuários de drogas. Quanto ao gênero feminino, cinco eram fumantes, porém não usavam drogas; três não fumavam e não usavam drogas, e de 4 pacientes se recusaram a fornecer informações.

4 I DESENVOLVIMENTO

Segundo Sharma et al. (2015), a candidíase é a infecção fúngica bucal mais comum no homem, podendo se apresentar em formas clínicas variáveis. Fato que, em algumas ocasiões, dificulta o diagnóstico. Muitos pacientes podem manifestar somente uma forma clínica, embora alguns pacientes desenvolvam mais de uma forma clínica. Este fato também foi verificado no nosso estudo, no qual 18 pacientes apresentaram mais de uma forma clínica.

Espécies do gênero *Candida* podem ser componentes normais da microflora bucal 30% a 50% da população sem evidência de infecção. No passado, a candidíase era considerada pelos pesquisadores como uma infecção oportunista que afetava indivíduos debilitados por outras doenças. Certamente, tais pacientes constituem uma significativa percentagem daqueles infectados por *Candida* spp.; porém na atualidade reconhecermos que a candidíase bucal pode se desenvolver em pessoas saudáveis. Segundo López & Marín (2001), a candidíase pseudomembranosa inicia-se pela exposição do paciente aos antibióticos de amplo espectro ou pela diminuição da imunidade do paciente. A exposição aos antibióticos é responsável por uma evolução da doença micótica que produz a forma

crônica de candidíase pseudomembranosa de longa duração. No diagnóstico das formas clínicas de candidíase em nosso trabalho, a forma clínica pseudomembranosa foi a mais frequente.

A evidência clínica ou não de infecção provavelmente depende de três fatores gerais: o estado imunológico do hospedeiro, o meio ambiente da mucosa nasal e a resistência das espécies do gênero *Candida* aos antifúngicos (ARMSTRONG-JAMES et al., 2014). Na análise dos nossos resultados, nem todos os pacientes apresentavam avaliação em relação ao grau da imunodepressão na ocasião em que foi colhido o material para análise laboratorial, entretanto, também estavam acometidos por outras patologias causadas por outros agentes microbianos, sendo a infecção por *C. albicans* (74%) a que mais se destacou. A prevalência de *C. albicans* é um fato confirmado por unanimidade por outros pesquisadores.

Segundo Patton et al. (1997) e Niziara et al. (2004), as lesões que ocorrem na cavidade bucal como a candidíase oral e a leucoplasia pilosa são consideradas importantes indicadoras prognósticas de progressão da infecção pelo HIV. A presença dessas lesões não só sugere a infecção pelo HIV, mas talvez sejam um dos primeiros sinais de evolução do indivíduo infectado pelo HIV para o desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Concordamos com a indicação dos autores citados, as recomendações sugeridas também são consideradas marcadores nos ambulatórios de clínica médica do município de Nova Iguaçu.

Favalessa et al. (2010) estudaram aspectos micológicos e as susceptibilidades in vitro de leveduras do gênero *Candida* em 102 pacientes HIV positivos no estado de Mato Grosso e encontraram 100% de positividade para espécies do gênero *Candida.* Entre estes pacientes foram diagnosticados 82 (78,1%) para *Candida albicans*, 8 (7,6%) *C. parapsilosis*, 8 (7,6%) *C. tropicalis*, 4 (3,8%) *C. krusei*, 2 (1,97%) *C. glabrata*. Esses resultados apresentam pequenas diferenças dos nossos resultados, porém a maior incidência naquele grupo também ocorreu por *C. albicans*.

Candidíase oral em pacientes HIV-positivos foi estudada por Santa Anna et al. (2006) no Instituto de Medicina Tropical de Puebla, México. Realizaram um estudo prospectivo para conhecer os aspectos clínicos e micológicos que incluíram 97 pacientes adultos infectados pelo HIV. A idade média dos participantes foi de 34,97 anos, distribuídos em 76 pacientes do gênero masculino e 21 do gênero feminino, A tendência sexual predominante foi a heterossexual, com 56, 7%, seguida da homossexual, com 24,7%, e bissexual, 8,5%. *Candida albicans* foi a espécie mais frequente, em 92%, seguida de *Candida* não-*albicans*, com 8%. A percentagem de *C. albicans* também foi a mais frequente em nossa pesquisa.

Segundo Ellepola & Samaranayake (2000) e Huang et al. (2005), pesquisas realizadas com pacientes HIV-positivos revelam que entre as espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* é o agente etiológico mais frequente nas candidíases da cavidade bucal nas infecções pelo HIV e casos de SIDA. Corroboramos com a citação desses autores

ao encontrarmos positividade para *C. albicans* de 74% entre os pacientes atendidos no município de Nova Iguaçu.

Um estudo sobre a candidíase bucal em pacientes HIV-positivos e com SIDA foi realizado por Machín et al. (1997). O estudo foi realizado com 25 pacientes internados no Hospital de Medicina Tropical Pedro Kouri na cidade de Havana, Cuba. Das quatro formas clínicas de candidíase oral em pacientes HIV-positivos e SIDA, a forma pseudomembranosa causada por *C. albicans* foi a mais comum e foi identificada em 17 dos 25 estudados (68%). A candidíase eritematosa causada por *C. tropicalis* foi diagnosticada em 8 pacientes (32%). Resultados semelhantes foram registrados entre pacientes da nossa pesquisa.

As referências sobre as formas clínicas de candidíase oral em pacientes HIV/SIDA diferem quanto à forma e a apresentação predominante. Os pesquisadores Machín et al*.* (1997) e Feigal et al*.* (1991) relataram a prevalência das lesões pseudomembranosas, como ocorreu também em nosso estudo, em que esta forma clínica foi registrada em 24 pacientes (74%) entre os 39 examinados. A forma clínica eritematosa foi a mais frequente entre os pacientes investigados por McCarthy et al*.* (1991); em nossos estudos, essa forma clínica ocorreu em 10 pacientes entre os 39 examinados.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo dessa pesquisa foi investigar a incidência de elementos parasitários e bacterianos na conjuntiva ocular e pálpebra de estudantes universitários da área das Ciências da Saúde usuários de lentes de contato. Entre os participantes, foi constatado que nem todos obedecem aos cuidados essenciais que devem ser aplicados em relação ao uso e a higienização das lentes. Nestes casos, como esses indivíduos já albergam agentes patogênicos na microbiota normal, a interposição de fatores predisponentes poderá induzir ceratites ou blefarites, entre outras lesões oculares.

Este foi o primeiro estudo sobre as espécies do gênero *Candida* envolvendo pacientes HIV/SIDA no município de Nova Iguaçu. Os resultados obtidos neste estudo confirmam uma alta prevalência de lesões bucais causadas por espécies do gênero *Candida* e apontam para uma maior valorização do exame da cavidade bucal como sinalizador de possível imunodeficiência. Devem ser realizados exames periodicamente em todos os pacientes HIV-positivos ou com suspeita da doença, considerando ser um achado clínico de utilidade. Candidíases da cavidade oral podem revelar uma redução da imunidade advertindo para a evolução da SIDA e advertindo para um maior cuidado na prevenção de doenças oportunistas.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, J. M. Candidíases orales. **Revista Ibero Americana de Micologia**, v. 19, p. 17-21, 2002.

ÁLVARES, C. A.; SVIRZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 435, p. 319-327, 2007.

ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G.; BRAUN, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 120-127, 2014.

BARBEDO, L. S.; SGARGI, D. B. G. Candidose. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 4, n. 22, p. 1, 2010.

COSTA, C. R. **Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes imunocomprometidos: caracterização molecular de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2009.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P. Oral candidal infections and antimycotics. **Critical Review in Oral Biology and Medicine**, v. 11, p. 173-198, 2000.

FAVALESSA, O. C.; MARTINS, M. A.; HAHN, R. C. Aspectos micológicos e suscetibilidade in vitro de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV positivos provenientes do estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 673-677, 2010.

FEIGAL, D. W.; KATZ, M. H.; GREENSPAN, D.; WESTENHOUSE, J.; WINKELSTEIN, W.; LANG, W. et al. The prevalence of oral lesions in HIV infected homosexual and bisexual men three. San Francisco Epidemiological Cohorts. **AIDS**, v. 5, n. 5, p. 519-525, 1991.

FUENTES, F. W. R. Candidíasis oral: su relevancia actual. **Revista de Odontoestomatología**, v. 4, n. 4, p. 4-9, 1992.

HARTMAN, A.; MISSIO, R.; HAMMAD, M. P.; ALVES, I. A. Incidência de *Candida* spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) no município de Santo Ângelo – RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecções**, v.6, n. 3, p. 125-130, 2016.

HUANG, C. C.; YANG, Y. L.; LAUDERDALE, T. L.; MCDONALD, J.; HSIAO, C. F.; CHENG, H. H. Colonization of Human Immunodeficiency Virus infected outpatients in Taiwan with *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1600-1603, 2005.

LIMA, M. C. B. F.; SILVA-JR, A.; TORRES, S. R. Prevalence of oral manifestations in HIV-infected children: a literature review. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 74, n. 3, p. 240-243, 2017.

LÓPEZ, E. M.; MARÍN, A. F. La candidíasis como manifestación bucal en el SIDA. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 38, n. 1, p. 25-32, 2001.

LÓPEZ, J. Actualización de candidíasis oral. **Revista Archivos de Odontología y Estomatología**, v. 13, n. 5, p. 259-272, 1997.

MACHÍN, G. M.; LANCHA, M. P.; CORVAGAL, J. M.; ANDREU, C. M. F.; TIRADO, F. B. Aislamento, identificación y tipificación de levaduras en pacientes HIV positivos con candidíasis oral. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 1-8, 1997.

MATSUKA, L. K. Análise de alguns aspectos clínicos e epidemiológicos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. **Arquivos Médicos do ABC**, v. 9, n. 2, p. 10-15, 1986.

MCCARTHY, G. M.; MACKIE, I. D.; KOVAL, J.; SANDHU, H. S.; DALEY, T. D. Factors associated with increased frequency of HIV-related oral candidiasis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 332-336, 1991.

MIZIARO, I. D.; LIMA, A. S.; CORTINA, R. A. C. Candidíase oral e leucoplasia pilosa como marcadores de progressão da infecção pelo HIV em pacientes brasileiros. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, n. 3, p. 310-314, 2004.

PATTON, L. L.; MCKAIG, R. G.; ROGERS, D.; STRAUSS, R. P.; ERON, J. J. The role oral manifestations of HIV and body signs in suspicion of possible HIV infection. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Radiology**, v. 85, n. 4, p. 416, 1998.

PINDBORG, J. J. Classification of oral lesions associated HIV infection. **Oral Surgery and Medical Oral Pathologies**, v. 67, p. 292-295, 1989.

SANTA ANNA, L. M. P.; ZARAGOZI, M. T. I.; RODALLEGAS, E. G. R.; HERRERO, B. L.; SANCHEZ, N. M.; FRANCISCO, N. C. et al. Candidíasis oral en pacientes soropositivos al HIV y casos SIDA. Aspectos clínicos, micológicos y terapéuticos. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 58, n. 3, p. 173-180, 2006.

SHARMA, G.; OBEROI, S. S.; VOHRA, P.; NAGPAL, A. Oral manifestations of HIV/AIDS in Asia: systematic review and future research guidelines. Journal of Clinical and Experimental Dentistry, v. 7, n. 3, p. 19-27, 2005.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2015.

CAPÍTULO 5

ELEMENTOS MICROBIANOS E PARASITÁRIOS ISOLADOS DE ESTUDANTES DA ÁREA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE USUÁRIOS DE LENTES DE CONTATO

Data de aceite: 01/11/2021
Data de submissão: 08/10/2021

Antonio Neres Norberg
Membro Titular da Academia Brasileira de Medicina Militar
Rio de Janeiro, RJ
Faculdade Metropolitana São Carlos – FAMESC
Bom Jesus do Itabapoana, RJ
ID Orcid: 0000-0002-6895-4586

Fernanda Castro Manhães
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF
Campos dos Goytacazes, RJ
ID Lattes: 1866461041232723

Paulo Cesar Ribeiro
Universidade Iguaçu - UNIG
Nova Iguaçu – RJ
ID Lattes: 4953842424495281

Alcemar Antonio Lopes de Matos
Faculdade Metropolitana São Carlos - FAMESC
Bom Jesus do Itabapoana, RJ
ID Lattes: 1033715849447118

Maria de Lourdes Ferreira Medeiros de Matos
Faculdade Metropolitana São Carlos - FAMESC
Bom Jesus do Itabapoana, RJ
ID Lattes: 5995684153528839

Edyala Oliveira Brandão Veiga
Faculdade Metropolitana São Carlos - FAMESC
Bom Jesus do Itabapoana, RJ
ID Lattes: 02208237822690

Nicolau Maués Serra Freire (*in memorian*)
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
Rio de Janeiro, RJ
ID Lattes: 6302923284671421

RESUMO: Diversos agentes bacterianos e parasitários podem colonizar a mucosa conjuntival e a pálpebra, participando da flora normal. Entretanto, estes microrganismos podem tornar-se patogênicos quando fatores externos, deficiências na imunidade ou alterações fisiológicas afetam a região ocular. O objetivo desta pesquisa foi identificar espécies de ácaros e bactérias em estudantes da área das Ciências da Saúde usuários de lentes de contato e orientá-los em relação ao uso adequado desse instrumento. Foram avaliados estudantes voluntários assintomáticos, e em 48 foi feita a remoção manual de cinco pestanas para a pesquisa microscópica de ácaros. Em 110 acadêmicos, foi coletado material do saco conjuntival, que foi posteriormente semeado em meios artificiais de cultura para a pesquisa de bactérias. Dentre os 48 investigados, 60,4% estavam parasitados por ácaros identificados como *Demodex folliculorum*. Dos 110 investigados para pesquisa de microbiota conjuntival, as culturas bacterianas foram positivas em 39 estudantes (35,5%). Dentre os que apresentaram culturas bacterianas positivas, os resultados foram: 19 (48,75%) *Staphylococcus* coagulase negativa, 8 (20,5%) de *Staphylococcus aureus*, 4 (10,3%) de *Corynebacterium* spp., 2 (5,1%) de *Streptococcus a-haemolyticus*, 3 (7,7%) de *Bacillus* spp., 2 (5,1%) de *Pseudomonas aeruginosa*, 1 (2,6%)

de *Serratia marcescens*. O teste de sensibilidade aos antibióticos revelou que duas cepas de *S. aureus* isoladas de estudantes frequentadores do ambiente hospitalar foram resistentes à vancomicina e à oxacilina, e sensíveis somente à gentamicina entre os vários antibióticos testados, portanto, essas duas cepas são consideradas multidrogarresistentes. Como os estudantes não apresentavam evidências de manifestações clínicas oculares, os ácaros e as espécies de bactérias encontradas foram considerados como constituintes da microbiota normal da pele, da pálpebra e da mucosa conjuntival. Entretanto, o uso inadequado das lentes de contato poderá constituir-se em um dos fatores predisponentes de infecções oculares.
PALAVRAS-CHAVE: Lentes de contato, ceratite, blefarite, demodicose palpebral, microbiota ocular.

MICROBIAL AND PARASITARY ELEMENTS ISOLATED FROM HEALTH SCIENCES UNDERGRADUATE STUDENTS USERS OF CONTACT LENS

ABSTRACT: Several bacterial and parasitic agents can colonize the conjunctival mucosa and the eyelid, participating in the normal flora. However, these microorganisms can become pathogenic when external factors, immunity deficiencies or physiological disturbances affect the ocular region. The objective of this research was to identify species of mites and bacteria among Health Sciences student users of contact lenses and to guide them about the appropriate use of these devices. Asymptomatic volunteer students were evaluated, and in 48 five eyelashes were removed for the microscopic research of mites. In 110 academics, material was collected from the conjunctival sac and seeded in artificial culture media for the research of bacteria. Among the 48 investigated, 60.4% were parasitized by mites identified as *Demodex folliculorum*. Of the 110 investigated for conjunctival microbiota research, bacterial cultures were positive in 39 students (35.5%). Among the positive cases, the results by species were: 19 (48,75%) *Staphylococcus* coagulase negative, 8 (20,5%) de *Staphylococcus aureus*, 4 (10,3%) *Corynebacterium* spp., 2 (5,1%) *Streptococcus* α-*haemolyticus*, 3 (7,7%) *Bacillus* spp., 2 (5,1%) *Pseudomonas aeruginosa*, 1 (2,6%) *Serratia marcescens*. The antibiotic susceptibility test revealed that two strains of *S. aureus* isolated from students attending the hospital environment were resistant to vancomycin and oxacillin and sensitive only to gentamicin among various tested antibiotics; therefore, these two strains are considered multidrug resistant. As the students did not presented signs of ocular clinical manifestations, mites and species of bacteria found were considered as constituents of the normal microbiota of the skin, eyelid and conjunctival mucosa. However, the improper use of contact lenses may be one of the predisposing factors for ocular infections.
KEYWORDS: contact lens, keratitis, blepharitis, eyelid demodicosis, ocular microbiota.

1 | INTRODUÇÃO

Cada globo ocular é protegido externamente pelas pálpebras, superior e inferior que se movimentam seguidamente para manter a lubrificação da superfície do olho. A divisão anatômica das pálpebras é feita de acordo com a disposição do músculo de Riolan (linha cinzenta) em: porção anterior, com pele, músculo, folículos pilosos e glândula de Zeis; porção posterior com tarso, conjuntiva e glândula de Meibomius (MARTINS, 2006).

A pele da pálpebra é continuamente agredida por agentes externos, entre os quais os parasitos, e a mucosa conjuntival está constantemente exposta a um grande número de microrganismos, porém apenas uma pequena parcela destes é capaz de produzir infecções. A habilidade da córnea em impedir infecções por estes microrganismos depende primariamente de uma superfície intacta e de um fluxo lacrimal normal e sua distribuição normal pela superfície do globo ocular. A deterioração do funcionamento dessas barreiras pode favorecer o desenvolvimento das infecções e de ulceração da córnea (SACRAMENTO et al., 2005; LEE et al., 2012).

A ceratite microbiana é considerada rara na ausência de fatores predisponentes. Historicamente a maioria dos casos de úlcera de córnea em todo o mundo era associada ao trauma ocular. Entretanto, a expansão do uso de lentes de contato aumentou em 10 a 20 vezes o risco da patologia entre os usuários desse tipo de instrumento (MORALES, 2001; CHEN & WEN, 2009).

A blefarite causada por ácaros do gênero *Demodex* tem distribuição mundial, sem prevalência por etnia, porém com predomínio no gênero feminino. Pessoas idosas são mais propensas a ser reservatório de *Demodex folliculorum*, espécie de ácaro encontrado nos folículos pilosos de humanos, e *D. brevis,* que coloniza as glândulas sebáceas anexas aos folículos pilosos. Os autores Uittebroeck et al. (1982) estimam que pelo menos 1/3 das crianças e adultos jovens, 1/2 de adultos, e 2/3 dos idosos estão em relação trófica com estas espécies de ácaros.

O objetivo dessa pesquisa foi investigar a incidência de elementos parasitários e bacterianos na conjuntiva ocular e pálpebra de estudantes universitários da área das Ciências da Saúde usuários de lentes de contato.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Participaram desta pesquisa 158 acadêmicos voluntários da área das Ciências da Saúde da Universidade Iguaçu, usuários de lentes de contato, assintomáticos. Uma vez a cada mês, por um período de 12 meses, foram recolhidos três cílios da pálpebra superior, e três da inferior de cada olho, de 48 voluntários. Os cílios eram removidos pelo próprio estudante e imediatamente entregues para o processamento laboratorial. A porção contendo o bulbo do cílio foi colocada sobre lâmina com meio de Hoyer, coberto com lamínula e deixado em descanso para a clarificação e posterior exame por microscopia de luz.

No estudo da microbiota conjuntival, participaram 110 acadêmicos voluntários. O material destinado ao exame bacteriológico foi coletado do saco conjuntival com suabe estéril e remetido ao Laboratório de Pesquisa em Doenças Parasitárias da Universidade Iguaçu, onde foi processado até uma hora após a coleta. O material foi semeado no meio de cultura de Brewer (tioglicolato) e incubado em estufa bacteriológica a 37ºC por 24

horas. O crescimento bacteriano foi submetido à coloração de Gram para a classificação por caracteres morfotintoriais. As culturas foram repicadas para placas de Petri contendo os meios: agar-sangue, agar-chocolate, agar-hipertônico-manitol e EMB-agar (Teague). As placas com os meios de cultura sólidos foram mantidas em temperatura de 37ºC por 24 horas. Procedeu-se à identificação por caracteres culturais, morfotintoriais e provas bioquímicas pelo sistema BioMerieux-Vitek para os bacilos Gram negativos. Os cocos Gram positivos aglomerados com colônias amarelo-douradas, plasmocoagulase-positiva, fermentadores de manitol e prova da dexorrribonuclease positiva foram identificados como *Staphylococcus aureus*. A identificação de *Streptococcus α-haemolyticus* foi realizada por caracteres morfotintoriais (cocos Gram positivos em cadeia) e hemólise *α* (alfa) no meio de cultura agar-sangue. As cepas de *Staphylococcus aureus* foram submetidas ao teste de antibiograma *in vitro* para testar a sensibilidade ou resistência aos antibióticos. Para este procedimento foi utilizada a técnica de Kirby-Bauer.

3 | RESULTADOS

Dos 48 universitários investigados, em 29 foi comprovado o parasitismo por *Demodex folliculorum*, correspondendo a uma prevalência de infestação de 60,4%. A comparação entre os indicadores de parasitismo nos gêneros dos hospedeiros resultou em diferença significativa, assim como a comparação entre as pálpebras superior e inferior. Também foram comparadas estatisticamente os níveis de parasitismo entre os olhos dos dois lados do rosto, cujas diferenças foram não significativas.

Do material coletado nos 110 acadêmicos voluntários houve crescimento bacteriano em 39, correspondendo a um coeficiente de prevalência de 35,5%. Foram isoladas sete espécies bacterianas (Tab.2), com maior incidência de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Caráter examinado		Masculino		Feminino	
Indicador		F (Nº)	CP (%)	F (Nº)	CP (%)
Olho direito	Pálpebra superior	5	55,6	10	52,6
	Pálpebra inferior	6	66,7	12	63,2
	Parasitados	9	37,5	19	79,2
	Não parasitados	15	62,5	5	20,8
Olho esquerdo	Pálpebra superior	6	60.0	10	52,6
	Pálpebra inferior	7	70.0	11	57,9
	Parasitados	10	41,7	19	79,2
	Não parasitados	14	58,3	5	20,8
Total de parasitados		10	41,7	19	79,2
Total de examinados		24	50.0	24	50.0

Tabela 1. Indicadores de parasitismo por *Demodex folliculorum* em cílios de 48 universitários voluntários dos cursos da área das Ciências da Saúde da Universidade Iguaçu usuários de lente de contato, município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, segundo o gênero dos participantes e o olho estudado.

Espécies de bactérias encontradas	F (Nº)	CP (%)
Staphylococcus coagulase negativa	19	48,7
Staphylococcus aureus	08	20,5
Corynebacterium spp	04	10,3
Streptococcus a-haemolyticus	02	5,1
Bacillus spp	03	7,7
Pseudomonas aeruginosa	02	5,1
Serratia marcescens	01	2,6
Total	39	100

Tabela 2. Espécies de bactérias encontradas na mucosa ocular em 39 dos 110 acadêmicos voluntários da área das Ciências da Saúde da Universidade Iguaçu, Rio de Janeiro, usuários de lentes de contato.

O teste de sensibilidade aos antibióticos (antibiograma) revelou que duas cepas de *S. aureus* isoladas de acadêmicos frequentadores do ambiente hospitalar foram resistentes à vancomicina e à oxacilina, e sensibilidade somente para a gentamicina entre os 28 antibióticos testados.

4 I DESENVOLVIMENTO

Os pesquisadores Livny et al. (2019) investigaram a prevalência de infestação por *Demodex* em um grupo de pacientes com blefarite crônica (60 indivíduos) e em um grupo de controle de pacientes que não apresentavam blefarite (50 indivíduos). Do grupo de indivíduos que apresentavam blefarite crônica, 44 pacientes (73,3%) estavam infestados por *Demodex*, enquanto no grupo de controle 21 indivíduos (40%) estavam parasitados

pelo ácaro. Esses autores concluíram que há uma importante relação entre a infestação por D*emodex* e a blefarite crônica.

A ocorrência de espécies de *Demodex* em pacientes com blefarite e em indivíduos saudáveis na Polônia foi o objeto de um estudo observacional de dez anos conduzido por Biernat et al. (2018). Esses autores estudaram 553 pacientes com blefarite e 115 voluntários sem doença ocular. Espécies do gênero *Demodex* foram encontradas em 62,4% dos indivíduos com blefarite e 24,3% daqueles que não apresentavam patologias oculares. Não houve uma associação estatística entre infestação e gênero dos pacientes, porém foi observada uma maior frequência de infestação dos pacientes maiores de 50 anos. Os autores concluíram que a prevalência ocular de infecção por *Demodex* está ligada diretamente à blefarite e aumenta conforme a idade.

Zeytun & Karakurt (2019) estudaram a prevalência de D*emodex* em pacientes com blefarite crônica e em indivíduos saudáveis na província de Erzincan, Turquia. Entre os 365 pacientes com blefarite, 79,2% estavam infectados por *Demodex*, e do grupo de controle, com 175 indivíduos sem problemas oculares, 31,4% estavam infectados. Os autores consideraram uma taxa de infestação muito alta em ambos os grupos, porém destacaram a alta prevalência de infestação por *Demodex* em pacientes com blefarite e indicaram que a verificação desse ácaro deva ser considerada no tratamento clínico de pacientes que chegam com essa condição ocular aos setores de oftalmologia.

Segundo Zhu et al. (2018), as infecções bacterianas ou as infestações por *Demodex* são apontadas como fatores que contribuem para a blefarite crônica. Esses autores investigaram a associação entre a infestação por *Demodex* e a flora bacteriana nos casos de blefarite. Foram avaliados no estudo 56 pacientes com blefarite e 46 indivíduos sem doenças oculares. Entre os indivíduos com blefarite, 80,36% estavam infectados por ácaros do gênero *Demodex*, e no segundo grupo, de controle, 45,65% apresentavam infestação por este parasito. Entre os achados bacteriológicos, 96,55% dos pacientes com blefarite apresentaram culturas positivas para 27 espécies de bactérias. No grupo de indivíduos saudáveis, apenas 16 espécies de bactérias foram encontradas. A incidência das espécies *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus* foram significativamente mais elevadas entre pacientes com blefarite quando comparada ao grupo de controle. Os autores ainda apontaram uma estreita relação entre *P. acnes* e *Demodex folliculorum*, sugerindo que esta associação tenha um papel importante na cronicidade da blefarite. Em nossa pesquisa, em que os participantes eram assintomáticos, a prevalência de infestação foi superior às encontradas nos grupos de controle investigados por por Livny et al. (2019), Biernat et al. (2018), Zeytun & Karakurt (2019) e Zhu et al. (2018), com 60,4% dos acadêmicos de Ciências da Saúde positivos para a infestação por ácaros do gênero *Demodex.*

Os fatores de risco da ceratite microbiana relacionados ao uso de lentes de contato em Singapura foram estudados por Lim et al. (2016). Entre 58 casos de ceratite, 14 foram positivos para os seguintes elementos bacterianos: *Pseudomonas aeruginosa* 12 (85,7%),

Serratia spp 1 (7,1%) e *Staphylococcus* coagulase negativa 1 (7,1%). Concluíram que o uso de lentes de contato é um risco para a ocorrência de ceratites, principalmente quando o paciente tem o hábito de dormir utilizando as lentes, não higienizar as mãos ou usar uma solução inadequada para a limpeza das lentes de contato.

A distribuição dos gêneros de bactérias e fungos associados às ceratites em um centro oftalmológico no sudeste da China foi estudada por Lin et al. (2017). Examinaram 2973 pacientes entre os anos de 2009 e 2013, diagnosticados com ceratite, e encontraram infecções microbianas em 46,05% das amostras, dos quais 25,5% forma positivas para bactérias, 26,8% foram positivas para fungos, e em 6,3% havia coinfecção de fungos e bactérias. Entre as bactérias encontradas, a maior prevalência foi para *Staphylococcus epidermidis* (31,9%), seguido por *Pseudomonas aeruginosa* (12,4%). Entre os elementos fúngicos, destacaram-se as espécies dos gêneros *Fusarium* (29,3%) e *Aspergillus* (24,1%).

Um estudo retrospectivo de 29 casos de ceratite infecciosa em pacientes usuários de lentes de contato foi conduzido pelo grupo de pesquisadores Khochtali et al. (2017) no departamento de oftalmologia do Hospital Universitário Fattouma Bourguiba, na cidade de Monastir, Tunísia, entre os anos de 2006 e 2016. Culturas bacterianas foram positivas para 18 pacientes (72,4%). A maior prevalência foi para *Pseudomonas aeruginosa* (41,4% dos casos), seguida por cistos de ameba, com 5 casos (17,3%), e um caso de ceratite por *Fusarium* spp. (3,5%). Os autores apontam que o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são condutas importantes que reduzem a morbidade ocular.

Tena et al. (2019) realizaram um estudo retrospectivo de ceratites infecciosas diagnosticadas entre os anos de 2010 e 2016 no Hospital Universitário de Guadalajara, Espanha, cujo universo de pesquisa correspondeu a 297 pacientes. Constataram que o maior fator de risco associado ao desenvolvimento de ceratites foi o uso de lentes de contato (33,2%). As ceratites bacterianas foram as mais frequentes, correspondendo a 64,6% dos casos diagnosticados, seguidas pelas ceratites virais (3,4%) e ceratites fúngicas (1%). Bactérias Gram positivas representaram 87,1% das ceratites bacterianas. Os microrganismos mais prevalentes foram: *Staphylococcus* coagulase-negativa (28,6%), *Propionibacterium* spp. (19,6%), *Corynebacterium* spp. (9,8%), *Streptococcus* spp. (9,4%), *Staphylococcus aureus* (9,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,4%), Enterobacteriaceae (3,9%), *Bacillus* spp. (3.1%).

Os pesquisadores Ferreira et al. (2016) estudaram o perfil clínico e microbiológico da ceratite microbiana em um hospital de referência de Portugal entre os anos de 2007 e 2015 e relataram que o uso de lentes de contato foi o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de ceratites bacterianas. Entre 235 pacientes examinados, encontraram uma positividade de 38,4%, com maior proporção para bactérias Gram positivas (70,8%). As espécies mais prevalentes foram: *Staphylococcus aureus* (23,1%), *Corynebacterium macginleyi* (20%), *Pseudomonas aeruginosa* (13,8%), *Streptococcus pneumoniae* (10,8%). Os autores comentaram que não isolaram cepas bacterianas multidrogarresistentes e que

seja dada uma maior atenção aos casos de ceratites por *Pseudomonas aeruginosa* pela capacidade dessa bactéria em adquirir resistência aos antimicrobianos.

Uma pesquisa para estimar a incidência de ceratite microbiana em Queensland, Austrália, entre os anos de 2005 e 2015, foi realizada por Green et al*.* (2018). Uma análise retrospectiva de dados de 3182 pacientes revelou uma positividade para microrganismos de 23,97%. Os agentes bacterianos mais frequentes foram: *Staphylococcus* coagulase-negativa (34%), *Staphylococcus aureus* (11%), *Streptococcus pneumoniae* (2%), outras bactérias Gram positivas (18%), *Pseudomonas aeruginosa* (18%), outros bastonetes Gram negativos (9%). Esses autores estimaram, com base nos dados e na população total, que a incidência de ceratites microbianas possui uma taxa de incidência de 0,66 casos para cada 10.000 pessoas.

As pesquisas realizadas por Lim et al*.* (2016), Lin et al*.* (2017), Ferreira et al*.* (2016), Khochtali et al*.* (2017), Tena et al*.* (2019) e Green et al*.* (2018) demonstram que há variações regionais e de acordo com os grupos estudados em relação à diversidade bacteriana na conjuntiva ocular. Entretanto, a despeito das peculiaridades, *Staphylococcus* coagulase-negativa sobressaem-se como o agente bacteriano que figura com maior frequência na flora normal da conjuntiva. Esse fato também foi verificado em nossa pesquisa.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo dessa pesquisa foi investigar a incidência de elementos parasitários e bacterianos na conjuntiva ocular e pálpebra de estudantes universitários da área das Ciências da Saúde usuários de lentes de contato. Entre os participantes, foi constatado que nem todos obedecem aos cuidados essenciais que devem ser aplicados em relação ao uso e a higienização das lentes. Nestes casos, como esses indivíduos já albergam agentes patogênicos na microbiota normal, a interposição de fatores predisponentes poderá induzir ceratites ou blefarites, entre outras lesões oculares.

Como os acadêmicos examinados não apresentavam manifestações clínicas oculares, concluiu-se que os ácaros e as bactérias isoladas constituíam a microbiota normal da mucosa, da pele e da pálpebra, porém o uso inadequado das lentes de contato poderá representar um dos fatores predisponentes a infecções oculares. O teste de sensibilidade aos antibióticos (antibiograma) revelou que duas cepas de *S. aureus* isoladas de acadêmicos frequentadores do ambiente hospitalar foram resistentes à vancomicina e à oxacilina, e sensibilidade somente para a gentamicina entre os 28 antibióticos testados. Essas duas cepas são consideradas multidrogarresistentes.

REFERÊNCIAS

BIERNAT, M. M.; RUSIECKA-ZRÓLKOWSKA, J.; PIATKOWSKA, E.; HELEMEJKO, I.; BIERNAT, P.; GOSCINIAK, G. Ocurrence of *Demodex* species in patients with blepharitis and in healthy individuals: a 10-years observational study. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 62, p. e628, 2018.

CHEN, L.; WEN, Y. M. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International Journal of Oral Sciences**, v. 3, p.66-73, 2011.

FERREIRA, C. S.; FIGUEIRA, L.; MOREIRA-GONÇALVES, N.; MOREIRA, R.; TORRÃO, L.; FALCÃO-REIS, F. Clinical and microbiological profile of bacterial microbial keratitis in a Portuguese tertiary referral center – Where are we in 2015?. **Eye Contact Lens**, v. 44, n. 1, p. 15-20, 2018.

GREEN, M.; CARNT, N.; APEL, A.; STAPLETON F. Queensland microbial keratitis database: 2005-2015. **British Journal of Ophthalmology**. Published Online First: 05 January 2019. Doi: 10.1136/bjopththalmol-2018-312881.

KHOCHTALI, S.; DALDOUL, N.; ZINA, S.; KSIAA, I.; ZAOUALI, S. et al. Contact lens-related infections keratitis: review of 29 cases. **Open Access Library**, v. 4, e3815, 2017.

LEE, S. H.; OB, D. H.; JUNG, J. Y.; KIM, J. C.; JEAN, C. O. Comparative Ocular Microbial Communities in Humans with and without Blepharitis. **Investigative Ophthalmology and Vision Sciences**, v. 53, n. 9, p. 5585-5593, 2012.

LIM, C. H. L.; CARNT, N. A.; FAROOK, M.; LAM, J.; TAN, D. T. et al. Risk factors for contact lens-related microbial keratitis in Singapore. **Eye**, v. 30, p. 447-455, 2016.

LIM, C. H. L; CARNT, N. A.; FAROOK, M.; LAM, J.; TAN, D. T.; MEHTA, J. S. Risk factors for contact lens- related microbial keratitis in Singapore. **Eye**, v. 30, p. 447-455, 2016.

LIN, L.; LAN, W.; LOU, B.; KE, H.; YANG, Y. et al. Genus distribution of bacteria and fungi associated with keratitis in a large eye center located in Southern China. **Ophthalmic Epidemiology**, v. 24, n. 2, p. 90-96, 2017.

LIVNY, E.; ROSENBLATT, A.; ABU-GHOSH, Z.; YASSUR, I.; BAHAR, I. Prevalence of Demodex parasites in patients with chronic blepharitis and healthy controls in Israel. **Harefuah**, v. 158, n. 2, p. 87-90, 2019;

MARTINS, M. C. Anatomia ocular. *In*: LOPES, A. C. **Tratado de Clínica Médica**. São Paulo: Ed. Roca, 2006.

MORALES, P. **Estudo dos fatores influentes na úlcera de córnea na região de Ribeirão Preto**. Ribeirão Preto: USP, 2001.

SACRAMENTO, R. S.; CASTRO, L.; FREITAS, D.; BRANCO, B. C.; LIMA, A. L. H. et al. Estudo dos fatores epidemiológicos e influentes na ceratite microbiana em serviço universitário. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 64, n. 1, p. 7-13, 2005.

TENA, D.; RODRÍGUEZ, N.; TORIBIO, L.; GONZÁLEZ-PRAETORIUS, A. Infections keratitis: microbiological review of 297 cases. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 72, n. 2, p. 121-123, 2019.

UYTTEBROECK, W.; NIJS, I.; MAUDGAL, P. C.; MISSOTTEN, L. Incidence of *Demodex folliculorum* on the eyelash follicle in normal people and in blepharitis patients. **Bulletin of the Society Belge Ophtalmololgy**, v. 201, p. 83-7, 1982.

ZEYTUN, E.; KARAKURT, Y. Prevalence and load of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevi*s (Acari: Demodicidae) in patients with chronic blepharitis in the Province of Erzincan, Turkey. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 1, p. 2-9, 2019.

ZHU, M.; CHENG, C.; YIN, H.; LIN, L.; WU, K. Quantitative analysis of the bacteria in blepharitis with *Demodex* infestation. **Frontiers Microbiology**, v. 9, p. 1719, 2018.

SOBRE O ORGANIZADOR

ALANA MARIA CERQUEIRA DE OLIVEIRA- Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Estadual de Santa Cruz -UESC (2002) com habilitação pelo CRBM 4 em Patologia Clínica -Análises Clínicas e Biologia Molecular , licenciada em Biologia pela Faculdade Cruzeiro do Sul (2020), licenciada em Pedagogia pela Faculdade Faveni (2021). Em 2021 se especializou em Saúde indígena pela Faculdade Dom Alberto. Obteve seu Mestrado (2006) e o Doutorado (2011) em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP-USP. Pós-Doutorado pelo Instituto Nacional de células Tronco, INCTC -USP (2012). O segundo Pós-doutoramento foi realizado pelo departamento de Clínica Médica Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP-USP (2014). Seu terceiro Pós-Doutorado pelo Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras-FFCL-USP (2016). Atualmente é docente no Instituto Federal do Acre -IFAC.

ÍNDICE REMISSIVO

B

C

G

H

I

L

Z

INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

@atenaeditora

www.facebook.com/atenaeditora.com.br

2

Ano 2022

INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

2

Ano 2022